

Tesis doctoral



Caracterización molecular y
funcional de la proteína de unión a
quimioquinas E163 de ECTV

Haleh Heidarieh Sorosh

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Director de tesis: Antonio Alcamí Pertejo

2015

Título: Caracterización molecular y funcional de la proteína de unión a quimioquinas E163 de ECTV

Doctorando: Haleh Heidarieh Sorosh. Licenciada en Bioquímica

Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología Molecular.

Facultad de Ciencias

Director de tesis: Antonio Alcamí Pertejo



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el **Centro de Biología Molecular Severo Ochoa** con la financiación de una de una ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (referencia BES-2010-030612) asociada al proyecto de investigación SAF2009-07857.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Habrá que empezar a escribir para que los sentimientos migren al lugar de las ideas y pensamientos, y de ahí añadiendo alguna **quimioquina** consiga hacerles brotar en forma de palabras escritas que intenten reflejar lo que quiero expresar. Voy a ello, a ver si soy capaz de no caer en demasiados sentimentalismos...

Agradecer a Antonio la posibilidad de haber hecho realidad mi sueño, dedicarme al mundo de la investigación científica y poder observar de cerca a los **virus** y sus **proteínas**, y a cómo se relacionan con el **sistema inmunitario**, algo que sinceramente me apasiona y siempre quise hacer. He podido crecer, aprender y trabajar con una persona que me ha **respetado** en todo momento y que siempre ha permitido que ahond ramos con **libertad** en aquello en lo que creíamos. No es frecuente ese tipo de confianza y libertad que yo he sentido trabajando aquí. Por otro lado, he de confesar que han habido momentos de pesimismo varios y que muchas veces, entrar al despacho significaba salir después con una sonrisa y una visión mucho más optimista de lo que tenía entre manos, gracias por el apoyo y por saber escuchar. Siempre ha habido tiempo para hablar cuando lo he necesitado.

El turno de los compañeros, el 227 o 203. Mi casa, mi familia, cierto que siempre hay personitas con las que uno tiene más afinidad que con otras, pero creo que en líneas generales, el ambiente en el que trabajamos y nos relacionamos ha sido muy positivo, **compañerismo**, ayuda científico-técnica, y moral es lo que siempre he sentido. Con algunos me une una buena y bonita **amistad** que ha ido fraguándose en el tiempo y s , también, las **risas**, qué importantes y necesarias son. Pues eso, muchas gracias **por ser y estar**, Rocío (*Doña Ro*), Juan (*-illo*), Abel (yo una vez tuve...), Bruno (*grunix/brunix*, según el día), M  Carmen (*Maricharmen*), Alberto L.B., Dani (*gags/contigs/gugelealo*), Sergio, Carol, Sole, Graciela, Marcos, Leyre, Carla, Alberto R. y Alberto D.

Hay más mundo fuera del laboratorio 203, por ejemplo, mi primera casa, el laboratorio de Esteban Domingo, el 221 dónde di mis primeros pasos y también fueron muy importantes para mí, a nivel científico y personal (Celia, Ignacio, Ana, Julie, Vero, Armando...). El 224, mis amigas Mar y Vero "peque". A mucha gente del CBM, Aldo, Alfonso G.G. porque su trato y inestimable ayuda, fueron siempre un placer; Berta y Silvia de citometría, que siempre han estado dispuestas a ayudarme y a

enseñarme con amabilidad y cariño, aunque las haya frito a dudas y preguntas infinitas (que me conozco...). Y a la gente que no nombro pero con la que he tenido un trato cordial en los pasillos, cultivos, animalario, cafetería, etc. Seguro que me dejo fuera a mucha gente, por descuido pero sin maldad...

Por último agradecer a mi familia y amigos externos al CBM. A mis padres, Ahmad y Mina, y por supuesto, a mi hermano Kaveh que siempre está conmigo en **todo**, un pilar básico en mi vida, incluso en el lavado de cara de la presente tesis.

A mis amigos no puedo no mencionarles, son sólo nombres para los que no les conocéis pero para mí son luz que alumbra mi vida (aunque suene cursi, lo sé) : Camelia, Natalia, Ithaisa, Marta, Ana Arroyo, Eva, Edu, Sandra, Neme, Maribel, Sara, etc.

ÍNDICE

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS..... | 15 |
| RESUMEN | 21 |
| ABSTRACT | 25 |
| 1 INTRODUCCIÓN | 29 |
| 1.1 POXVIRIDAE..... | 29 |
| 1.1.1 Origen | 29 |
| 1.1.2 Genoma | 29 |
| 1.1.3 Descripción del virión | 29 |
| 1.1.4 Ciclo de replicación viral..... | 30 |
| 1.1.5 Clasificación taxonómica de la familia poxviridae..... | 31 |
| 1.1.5.1 VARV | 31 |
| 1.1.5.2 1.5.2. MPXV, VACV y CPXV | 32 |
| 1.1.5.3 ECTV..... | 33 |
| 1.2 MODULACIÓN INMUNOLÓGICA POR POXVIRUS | 33 |
| 1.2.1 Sistema complemento y citoquinas interleuquina-1 (IL-1) e IL-18 | 33 |
| 1.2.2 TNF..... | 34 |
| 1.2.3 IFN | 35 |
| 1.2.4 CKs | 35 |
| 1.2.4.1 Estructura e interacción GPCR-CK | 36 |
| 1.2.4.2 Transducción de la señal tras activación del GPCR | 37 |
| 1.2.4.3 Interacción CKs-GAGs | 37 |
| 1.2.5 vCKBPs | 39 |
| 1.2.5.1 35-kDa | 39 |
| 1.2.5.2 A41..... | 40 |
| 1.2.5.3 M-T7 de MYXV..... | 41 |
| 1.2.5.4 Familia de proteínas de poxvirus que contienen el dominio SECRET | 42 |
| 1.2.5.5 M3 de gamma-herpesvirus 68 (MHV-68)..... | 42 |
| 1.2.5.6 Glicoproteína G (gG) de alfa-herpesvirus..... | 43 |

| | | |
|----------|--|----|
| 1.2.5.7 | vCKBP de virus orf (ORFV), pUL21.5 de citomegalovirus humano y R17 de herpesvirus Perú | 43 |
| 1.2.5.8 | CKBPs no virales | 44 |
| 1.3 | MODELO <i>MOUSEPOX</i> | 44 |
| 1.3.1 | Respuesta inmune frente a ECTV | 45 |
| 1.3.1.1 | Respuesta inmune innata | 45 |
| 1.3.1.2 | Respuesta celular adaptativa | 46 |
| 2 | OBJETIVOS | 51 |
| 3 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 55 |
| 3.1 | Líneas celulares | 55 |
| 3.2 | Virus..... | 55 |
| 3.3 | CKs | 56 |
| 3.4 | Clonajes | 56 |
| 3.5 | Generación de baculovirus recombinantes..... | 58 |
| 3.6 | Expresión y purificación de proteínas recombinantes | 58 |
| 3.7 | Cromatografía de exclusión por tamaño molecular..... | 59 |
| 3.8 | Generación de Ab policlonales de conejo frente a E163 | 60 |
| 3.9 | Preparación de SN de células infectadas con ECTV..... | 60 |
| 3.10 | CITOMETRÍA DE FLUJO | 61 |
| 3.10.1 | Titulación del Ab policlonal anti-E163 | 61 |
| 3.10.2 | Ensayos de unión a superficie celular | 61 |
| 3.10.2.1 | Proteína E163 y 35-kDa recombinantes | 61 |
| 3.10.2.2 | SN de infección con virus..... | 62 |
| 3.10.2.3 | Ensayos con CK biotinilada | 62 |
| 3.11 | Ensayos de interacción por SPR | 63 |
| 3.11.1 | Interacción entre E163 y CKs..... | 63 |
| 3.11.2 | Interacción de proteínas con GAGs..... | 64 |
| 3.12 | Generación de ECTV recombinantes..... | 64 |
| 3.13 | Amplificación y semipurificación de ECTV mediante colchón de sacarosa..... | 65 |
| 3.14 | Ensayos de formación de placa de lisis | 66 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.15 | Ensayos de infección <i>in vitro</i> : ciclo único y progresión | 66 |
| 3.16 | Purificación y amplificación de ADN viral para su secuenciación por la tecnología Illumina | 66 |
| 3.17 | Secuenciación del genoma y ensamblaje..... | 67 |
| 3.18 | WB | 67 |
| 3.19 | Experimentos de infección en ratones..... | 68 |
| 3.19.1 | Ensayos de DL ₅₀ | 68 |
| 3.19.2 | Ensayos de diseminación viral y determinación de título viral en órganos | 69 |
| 3.19.3 | Ensayos de transmisión viral en ratones | 69 |
| 3.20 | ANÁLISIS CELULAR EN INFECCIONES CON RATONES POR CITOMETRÍA DE FLUJO | 70 |
| 3.20.1 | Análisis de linfocitos T colaboradores, Th2, LTc, células NK y CD | 70 |
| 3.20.2 | Análisis de LTc y células NK | 70 |
| 3.20.3 | Análisis de la respuesta celular a largo plazo de LTc mediante activación <i>ex vivo</i> | 71 |
| 3.21 | Análisis estadístico | 72 |
| 3.22 | Alineamiento de proteínas y representación de la estructura tridimensional | 72 |
| 4 | RESULTADOS | 75 |
| 4.1 | E163 <i>in vitro</i> | 75 |
| 4.1.1 | E163 de ECTV es una glicoproteína de unión a GAGs | 75 |
| 4.1.1.1 | Identificación de las zonas de unión a GAGs en E163 | 75 |
| 4.1.1.2 | Clonaje de E163 y mutagénesis dirigida de las zonas de unión a GAGs..... | 76 |
| 4.1.1.3 | Generación de baculovirus recombinantes que expresan las proteínas E163 y las versiones mutadas | 77 |
| 4.1.1.4 | Purificación y cuantificación de las proteínas E163 y E163-1 a E163-7..... | 78 |
| 4.1.1.5 | Ensayos de interacción a GAGs por SPR..... | 78 |
| 4.1.1.6 | Ensayos de unión a superficie celular de la proteína E163 | 79 |
| 4.1.2 | La proteína E163 es una vCKBP | 83 |
| 4.1.2.1 | Ensayo de unión de E163 y E163-1 a E163-5 a CKs por SPR..... | 83 |
| 4.1.2.2 | Determinación de las afinidades de unión de E163 y E163 mutantes a CKs mediante SPR | 85 |
| 4.1.2.3 | Capacidad de la proteína E163 de interferir la unión de CKs a la superficie celular | 85 |
| 4.1.3 | La proteína E163 oligomeriza | 86 |
| 4.1.3.1 | Cromatografía de exclusión molecular de E163..... | 86 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 4.1.3.2 | Ensayo de interacción de E163 consigo misma por SPR | 89 |
| 4.2 | 35-kDa <i>in vitro</i> | 90 |
| 4.2.1 | Clonaje y expresión de la proteína 35-kDa de ECTV | 90 |
| 4.2.2 | Purificación y cuantificación de la proteína 35-kDa de ECTV | 90 |
| 4.2.3 | Alineamiento de secuencias de la vCKBP 35-kDa de poxvirus | 90 |
| 4.2.4 | Ensayo de unión a GAGs por SPR | 91 |
| 4.2.5 | Ensayos de unión a GAGs por citometría de flujo | 91 |
| 4.2.6 | Mecanismo de acción de la vCKBP 35-kDa en superficie celular con CK biotinilada | 92 |
| 4.3 | E163 <i>in vivo</i> | 96 |
| 4.3.1 | Generación de virus recombinantes delecionados en el gen <i>E163 (EVN163)</i> de ECTV | 96 |
| 4.3.2 | La proteína E163 no se expresa en una infección con ECTV Δ E163 | 96 |
| 4.3.3 | Secuenciación del genoma de ECTV Δ E163 | 98 |
| 4.3.4 | La proteína E163 de ECTV no está implicada en la replicación ni en la dispersión viral | 99 |
| 4.3.5 | La proteína E163 no afecta a la formación de las placas de lisis en ECTV | 101 |
| 4.3.6 | Experimentos <i>in vivo</i> | 101 |
| 4.3.6.1 | Los ratones BALB/c infectados con ECTV Δ E163 tienen un tiempo medio de muerte (TMM) menor a los infectados con el virus parental | 101 |
| 4.3.6.2 | En la dosis de infección de 1 ufp, ECTV Δ E163 es más virulento que ECTV en ratones BALB/c | 102 |
| 4.3.6.3 | Con ratones B6, el TMM es menor en las infecciones con el virus delecionado, en las dosis mayores comparado con el virus parental | 102 |
| 4.3.6.4 | Análisis de la respuesta inmune celular en animales infectados | 107 |
| 4.3.6.5 | Análisis de LTc y células NK en ratones infectadas con ECTV Δ E163 y ECTV | 107 |
| 4.3.6.6 | ECTV Δ E163 es más virulento que el virus parental en la dosis de 0,1 ufp/animal, con ratones BALB/c | 109 |
| 4.3.6.7 | ECTV Δ E163 es más virulento que el virus parental en las dosis de 10 ⁵ ufp con ratones B6 | 114 |
| 4.3.6.8 | Ensayo de transmisión <i>in vivo</i> con ratones infectados con ECTV Δ E163 y ECTV | 115 |
| 4.3.6.9 | Replicación viral en ratones infectados con ECTV Δ E163 y ECTV | 116 |
| 4.3.6.10 | Aumento de linfocitos Th2 en ratones infectados con ECTV Δ E163 frente a la infección con ECTV | 117 |
| 4.4 | 35-kDa <i>in vivo</i> | 124 |
| 4.4.1 | Análisis del gen <i>35kDa (EVN001)</i> en ECTV35kDa-mut | 124 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.4.2 | ECTV35kDa-mut no expresa la proteína 35-kDa | 124 |
| 4.4.3 | ECTV35kDa-mut está atenuado respecto a ECTV en una infección <i>in vivo</i> | 125 |
| 4.4.4 | Secuenciación del genoma completo de ECTV35kDa-mut | 126 |
| 5 | DISCUSIÓN..... | 133 |
| 5.1 | Interacción de proteínas con GAGs..... | 133 |
| 5.2 | Mecanismos de acción de las vCKBPs | 133 |
| 5.2.1 | Mecanismo de acción de 35-kDa de ECTV | 133 |
| 5.2.2 | Mecanismo de acción de E163..... | 134 |
| 5.2.2.1 | Caracterización de las zonas de unión a GAGs en E163..... | 135 |
| 5.2.2.2 | Las zonas de unión a GAGs y de unión a CKs en E163 no son totalmente independientes 136 | |
| 5.2.2.3 | E163 es capaz de oligomerizar | 136 |
| 5.2.2.4 | E163 es capaz de interferir la unión de CCL21 a una superficie celular mediada por GAGs 136 | |
| 5.3 | Papel de 35-kDa de ECTV en <i>mousepox</i> | 138 |
| 5.4 | Papel de la A41 en la infección con VACV..... | 138 |
| 5.5 | Papel inmunomodulador de E163 en la infección por ECTV..... | 139 |
| 5.5.1 | Supervivencia, síntomas de enfermedad y pérdida peso en BALB/c..... | 139 |
| 5.5.2 | Supervivencia, síntomas de enfermedad y pérdida peso en ratones B6..... | 140 |
| 5.6 | Análisis celular en la infección con ECTV-E163 y ECTV..... | 141 |
| 5.6.1 | Análisis celular en BALB/c infectados con ECTV..... | 143 |
| 5.6.2 | Análisis de leucocitos en B6 infectados con ECTV..... | 144 |
| 6 | CONCLUSIONES | 149 |
| 7 | BIBLIOGRAFÍA | 153 |

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| Ab | anticuerpo |
| APC | célula presentadora de antígeno |
| B6 | C57BL/6 |
| BSA | albúmina de suero bovino |
| CD | célula dendrítica |
| CEV | virión con envuelta asociado a la célula |
| CK | quimioquina |
| CKBP | proteína de unión a quimioquina |
| CKR | receptor de quimioquina |
| CMC | carboximetilcelulosa |
| CPXV | virus cowpox |
| CRD | dominio rico en cisteínas |
| CrmD (A, B, C, E) | modificador de la respuesta de citoquinas D (A, B, C, E) |
| d | día |
| DL ₅₀ | Dosis letal 50 |
| DMEM | medio esencial mínimo de Dulbecco |
| dpe | día post-exposición |
| dpi | día post-infección |
| ECTV | virus ectromelia |
| EEV | virión con envuelta extracelular |
| eIF-2 α | factor de iniciación eucariota 2 α |
| ELISA | ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| FACS | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> |
| FCS | suero fetal de ternera |
| FP | subcutánea en la almohadilla plantar de la pata |
| GAG | glicosaminoglicano |
| GFP | proteína fluorescente verde |
| gG | glicoproteína G |
| GPCR | receptor de quimioquina |
| GzB | granzima B |
| H | heparina |
| hpi | hora post-infección |

| | |
|----------|--|
| HR | humedad relativa |
| HS | heparán sulfato |
| HSV-1/2 | virus del herpes simple 1/2 |
| IEV | virión intracelular con envuelta |
| IFN | interferón |
| IFNRI/II | receptor de interferón |
| IL | interleuquina |
| IMV | virión intracelular madura sin envuelta |
| IN | intranasal |
| IRF3/7 | factor de regulación de interferón 3/7 |
| ITR | terminales repetidas invertidas |
| IV | virión inmaduro sin envuelta |
| LB | linfocito B |
| LT | linfocito T |
| LTc | linfocito T citotóxico CD8+ |
| MAPK | quinasas activadas por mitógenos |
| MHC | complejo mayor de histocompatibilidad |
| moi | multiplicidad de infección |
| MPXV | virus monkeypox |
| MVA | virus Ankara modificado |
| MVH-68 | virus herpes murino-68 |
| MYXV | virus mixoma |
| NCLDV | virus ADN de gran tamaño nucleo-citoplásmicos |
| NFκB | factor nuclear κB |
| Ni-NTA | columnas de agarosa níquel |
| NK | célula asesina natural |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPXV | ortopoxvirus |
| ORFV | virus orf |
| PAC | puromicin acetiltransferasa |
| PAMPs | patrones moleculares asociados a patógenos |
| PBS | tampón fosfato salino |
| PFA | paraformaldehído |
| PG | proteinglicano |
| PI3K | kinasa que fosforila en 3' al fosfatidilinositol |

| | |
|---------------------|--|
| rmf | resistencia a <i>mousepox</i> |
| RT | temperatura ambiente |
| RU | unidad de resonancia |
| SCP | SECRET containing protein |
| SDS-PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato |
| SECRET | <i>smallpox virus encoded chemokine receptor</i> |
| SgG | glicoproteína G secretada |
| SN | sobrenadante |
| SPR | resonancia de plasmón superficial |
| STAT _{1/2} | transductor de señal y activador de la transcripción 1/2 |
| TLR | receptores de tipo <i>Toll</i> |
| TMM | tiempo medio de muerte |
| TNF | factor de necrosis tumoral |
| TNFR | receptor del factor de necrosis tumoral |
| UFP | unidad formadora de placa |
| VACV | virus vaccinia |
| VARV | virus de la viruela |
| vCKBP | proteína viral de unión a quimioquina |
| vIFN- γ R | receptor viral del IFN- γ |
| VIH | virus de la inmunodeficiencia humana |
| vIL-1 β R | receptor viral de interleuquina 1 β |
| vIL18BP | proteína viral de unión a IL-18 |
| VTNFR | receptor viral del factor de necrosis tumoral |

RESUMEN

RESUMEN

Una de las principales funciones de las quimioquinas (CK), citoquinas quimiotácticas, es promover el reclutamiento de leucocitos hacia el foco de infección. Dos interacciones secuenciales son fundamentales para la actividad de las CKs, primero, una interacción con la superficie celular mediada por glicosaminoglicanos (GAGs), y segundo una unión con su receptor celular específico, del tipo de 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G (GPCR) que induce una serie de cascadas intracelulares. La interacción con GAGs permite la formación del gradiente quimiotáctico necesario para la haptotaxis y, además, la oligomerización de las CKs. Se ha descrito que para la actividad de las CKs *in vivo* es esencial la interacción con GAGs.

Los poxvirus han desarrollado múltiples estrategias para interferir con el sistema inmune del hospedador, incluyendo la expresión de proteínas solubles de unión a CKs sin similitud de secuencia con proteínas celulares (vCKBPs). Estas proteínas pueden inhibir la unión de las CKs con su receptor, como ocurre con la proteína 35-kDa del virus vaccinia, o impedir la interacción CK-GAGs, uniéndose a las CKs por el dominio de unión a GAGs de éstas, como ocurre con la proteína A41 del virus vaccinia y su ortólogo E163 del virus ectromelia (ECTV). Independientemente, algunas vCKBPs interaccionan ellas mismas con GAGs, como es el caso de E163, pero las implicaciones biológicas de esta interacción no se han estudiado en profundidad.

El objetivo principal de esta tesis ha sido la caracterización de la vCKBP E163. Hemos identificado la zona de unión a GAGs en E163 mediante mutagénesis dirigida, resonancia de plasmón superficial y citometría de flujo. Con proteínas mutadas en la zona de unión a GAGs mostramos que las zonas de unión a GAGs y CKs en E163 no son totalmente independientes. Además, hemos demostrado que tanto E163 como 35-kDa son capaces de prevenir la interacción de CKs a GAGs expresados en una superficie celular y esta actividad puede ser un mecanismo molecular para explicar su acción inmunomoduladora. Sin embargo, el complejo E163-CK permanece anclado a la superficie celular, debido a la interacción de E163 con los GAGs celulares, y proponemos que de esta forma E163 evitaría la configuración espacial necesaria para una eficiente transducción de señales de las CKs a través de su receptor específico y su función *in vivo*. De acuerdo con este modelo, E163 interrumpe tanto la formación del gradiente de CKs en la superficie celular como la transducción de señales a través del GPCR cuando las CKs se presentan desde una superficie celular.

El modelo de *mousepox* nos permite investigar la relación de poxvirus virulentos con su hospedador natural. Hemos generado un virus deleciónado en el gen *E163* (ECTVΔE163) y hemos observado que ECTVΔE163 tiene una mayor virulencia que el virus parental en ratones BALB/c y C57BL/6. El aumento de la virulencia observada no es debida a una mayor replicación ni a la dispersión viral del virus mutante. Analizando las poblaciones celulares en ganglios linfáticos, encontramos un aumento de la población de las células Th2 y linfocitos citotóxicos CD8⁺ activados en ratones BALB/c infectados con ECTVΔE163, comparado con el virus parental, mientras que en ratones C57BL/6 solamente detectamos un incremento en células Th2. Los resultados obtenidos demuestran un papel inmunomodulador de la proteína E163, que se centra principalmente en la inhibición de la población de linfocitos Th2 en fases tempranas de la infección, y su contribución a la patogénesis de ECTV.

ABSTRACT

ABSTRACT

One of the major roles of chemokines (Locksley et al.), chemotactic cytokines, is to promote leukocyte recruitment to sites of infection. Their biological activity needs two sequential and essential interactions, first, an interaction with glycosaminoglycans (GAGs) at the cellular surface, and second, binding to cell-surface receptors with seven-transmembrane domains coupled to G proteins (GPCRs), that activates specific signalling pathways. The GAG interaction facilitates the formation of a chemotactic gradient of CKs required for cell haptotaxis and CK oligomerization. It has been shown that CK-GAG interactions are essential for the *in vivo* function of CKs.

Poxviruses have evolved a variety of mechanisms to interfere with the host immune system, including the expression of viral secreted CK binding proteins with no sequence similarity to their cellular counterparts (vCKBPs). These proteins can abrogate the interaction between CKs and their receptor, as it is the case of the vaccinia virus 35-kDa protein, or they can interfere with the GAG-CK interactions, as shown for the vaccinia virus A41 protein and its ortholog E163 from ectromelia virus (ECTV). Independently, some vCKBPs may interact with GAGs, as it is the case of E163 from ECTV, but the biological implications of this interaction are still unknown.

The E163 vCKBP characterization was the main goal of the present PhD Thesis. By site-directed mutagenesis, surface plasmon resonance and flow cytometry, we have characterized the E163 GAG binding region. With E163 mutant proteins lacking GAG binding activity, we show that the GAG binding and CK binding regions of this protein are not totally independent. Also, we have demonstrated that both E163 and 35-kDa vCKBPs prevent CK binding to cell surface GAGs and this provides a molecular mechanism for its immunomodulatory activity. However, the E163-CK complex remains anchored at the cellular surface through the interaction of E163 with cellular GAGs, and we propose that in this way E163 may interfere with the CK spatial configuration necessary for an efficient signalling through their specific receptor and its *in vivo* function. According to this model, E163 may interfere with the formation of a CK gradient at the cell surface as well as with signalling through their GPCR when CKs are presented from a cell surface.

The *mousepox* model allows us to investigate the interaction between virulent poxviruses and their natural host. We have generated a recombinant virus deleted in the *E163* gene (ECTVΔE163), and we have observed that ECTVΔE163 is more virulent than the wild-type virus in BALB/c and C57BL/6 mice. The higher virulence is not the consequence of higher replication rates or dispersion of the mutant virus. We have detected an increased recruitment of Th2 cells and activated CD8⁺ cytotoxic lymphocytes to the lymph nodes in BALB/c mice infected with ECTVΔE163, compared with ECTV, whereas in C57BL/6 mice only a higher presence of Th2 cells was detected. Our results demonstrate a role of E163 protein as an immune modulatory factor, with a major function in the inhibition of Th2 lymphocytes at early phases of infection, and its contribution to the pathogenesis of ECTV.

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 POXVIRIDAE

1.1.1 Origen

Los grandes virus de ADN núcleo-citoplásmicos (NCLDV) se componen de 5 familias que infectan eucariotas: *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae*, *Iridoviridae*, *Asfarviridae* y *Poxviridae* (Mutsaers et al., 2010). Los NCLDV tienen un conjunto conservado de proteínas homólogas esenciales con funciones estructurales y de replicación viral (~35 genes), por ello se postula que tienen un origen común. La transferencia horizontal de genes con la célula, los elementos genéticos móviles y las duplicaciones génicas son algunas de las variables responsables de la gran diversidad en tamaño y composición genómica de estos virus (Filee, 2009; Iyer et al., 2006). Los poxvirus tienen una mayor tendencia al intercambio de genes con sus hospedadores que iridovirus y asfarvirus (Filee, 2009).

1.1.2 Genoma

Los poxvirus son virus con genoma ADN de doble banda lineal (~ 130-360 kb). Todos los miembros de la familia comparten 49 genes, pero el género orthopoxvirus (OPXV), además, comparte otros 41 adicionales. Los poxvirus tienen como hospedadores naturales desde mamíferos, aves, reptiles y hasta insectos. Una gran parte de su genoma se relaciona con la interacción con su hospedador. En los extremos del genoma hay 2 repeticiones terminales invertidas (ITRs) (<0,1-12,4 kb). Las ITRs incluyen grupos de secuencias repetidas con distinta longitud (Lefkowitz et al., 2006). Ambas cadenas de ADN están unidas covalentemente formando una horquilla con un *loop* terminal (Baroudy and Moss, 1982; Lefkowitz et al., 2006). En la zona central del genoma se agrupan los genes esenciales y conservados (replicación, transcripción y ensamblaje del virión), mientras que en los extremos se sitúan los genes más variables relacionados con la interacción con el huésped (Witte, 1982). El genoma tiene un alto contenido en A+T (OPXV ~70%) (Lefkowitz et al., 2006). Cerca del *loop* de la horquilla terminal hay 2 secuencias de nucleótidos conservadas esenciales en la resolución del concatémero intermediario generado en la replicación viral (Merchinsky, 1990). Los promotores y las secuencias del extremo 5' no codificante de los genes en poxvirus están altamente conservados (Lefkowitz et al., 2006).

1.1.3 Descripción del virión

La estructura tridimensional de la partícula viral del virus vaccinia (VACV), del virión inmaduro intracelular (IMV), fue resuelta en 2005. Tiene una característica forma en ladrillo con un tamaño ~ 200-360 nm. Son virus envueltos en una bicapa lipídica con 2 cuerpos laterales densos y un nucleóide viral protegido por 2 paredes lipídicas, la externa es discontinua y con prolongaciones proyectadas hacia el exterior (Cyrklaff et al., 2005).

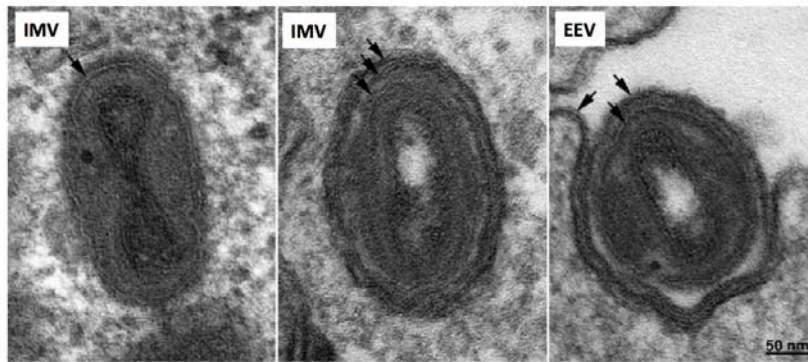


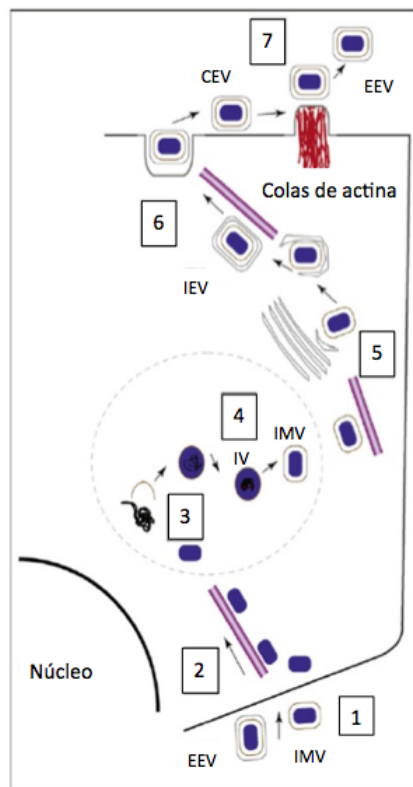
Fig. 1. Imágenes del virión de VACV tomadas por microscopía electrónica de transmisión. Fig. adaptada de Moss B., 2005.

VACV es el virus más estudiado y empleado como prototipo de poxvirus. Dos formas son infectivas: IMV y el virión extracelular con envuelta (EEV) (Fig. 1). Se diferencian en la unión a la superficie celular, entrada, salida y la diseminación viral. IMV tiene una única membrana lipídica, es el primer virión en ser generado y tiene proteínas antigénicas, blanco de la neutralización por anticuerpos (Ab). El virión con envuelta y asociado a la célula (CEV) (Homey et al.) tiene 2 membranas lipídicas y al salir de la célula, queda unido a la superficie induciendo la formación de colas de actina a través de la proteína A36 (Frischknecht et al., 1999). EEV utilizará las colas de actina para la diseminación en células no infectadas (Roberts and Smith, 2008). La morfogénesis del virus sucede en factorías virales que contienen el virión inmaduro (IV) (Fig. 2). El genoma es empaquetado en IV y se generará el IMV que sale de la célula por lisis. Algunos IMV salen de la factoría viral y se cubren de una segunda membrana que se adquiere por ruta endosomal (Tooze et al., 1993) o trans-Golgi (Schmelz et al., 1994) generando viriones intracelulares con envuelta (IEV). Los IEVs son transportados por filamentos de actina a la periferia celular (Roberts and Smith, 2008).

1.1.4 Ciclo de replicación viral

Las proteínas de la superficie del IMV interactúan con glicosaminoglicanos (GAGs) de la superficie celular, aunque dicha unión no es imprescindible para la entrada del virus. También se han descrito interacciones entre proteínas virales y lamininas celulares pero aún no es conocido el receptor/es celulares. La entrada de IMV puede darse por fusión de membranas con la célula, por endocitosis seguida de fusión de membranas o por macropinocitosis (Roberts and Smith, 2008) (Fig. 2). La membrana externa se interrumpe por la acción de proteínas (A34 y B5) que inducen una reacción no fusogénica que libera al virión con la membrana interna únicamente (Law et al., 2006). EEV e IMV introducen el nucleóide viral en el citoplasma celular que será transportado por filamentos de actina (Carter et al., 2003). El nucleóide porta el genoma viral muy compactado y enzimas esenciales para la replicación y transcripción, así como proteínas estructurales. La expresión génica es secuencial, la transcripción de genes tempranos va dirigida al control de la maquinaria celular, evadir el sistema inmune, a la replicación viral y a factores de transcripción para la expresión de genes intermedios.

Tras la replicación viral comienza la transcripción de genes intermedios que principalmente son factores de transcripción para la expresión de genes tardíos. Estos últimos son enzimas de empaquetamiento del



genoma en el virión y factores de transcripción de genes tempranos, además de proteínas de interacción con el hospedador y evasión inmune (Roberts and Smith, 2008).

EEV es la principal forma de diseminación, está adaptada al transporte rápido por colas de actina y es menos inmunogénico que IMV. Mutantes de VACV para formar EEV son avirulentos *in vivo* (Roberts and Smith, 2008). Las proteínas A33 y A36, de expresión temprana, son responsables de la formación de colas de actina que impulsan a las partículas virales hasta células no infectadas aún (Doceul et al., 2010).

Figura 2. Ciclo de replicación de Poxvirus. Representación esquemática de las fases del ciclo viral. 1. Unión a la célula y fusión de la membrana. 2. El nucleóide viral es transportado por microtúbulos en el citoplasma. 3 y 4. Replicación y morfogénesis en factorías virales. 5. Los IMVs se transportan a zonas distales por microtúbulos rodeándose de una membrana extra y dando lugar a IEVs. 6. Los IEVs se transportan a la membrana celular. 7. La membrana externa se fusiona dejando libre a CEV en la superficie celular y será impulsada por los filamentos de actina que polimerizan debajo. El CEV también puede dar lugar a EEV para su dispersión. Figura adaptada de Roberts and Smith, 2008.

1.1.5 Clasificación taxonómica de la familia poxviridae

Los poxvirus tienen 2 subfamilias, *Entomopoxvirinae* que infectan artrópodos y *Chordopoxvirinae* que infectan vertebrados. Avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, parapoxvirus, suipoxvirus, OPXV, parapoxvirus, yatapoxvirus y molluscum poxvirus son los 8 géneros que componen la subfamilia *Chordopoxvirinae*. Los 4 últimos géneros infectan humanos. Dentro del género OPXV, las especies que infectan humanos son: virus monkeypox (MPXV), virus cowpox (CPXV), VACV y virus de la viruela (VARV). Solamente hay 2 especies que tienen como hospedador al hombre, VARV y virus *molluscum contagiosum* (Fields, Virology, 5th edition).

1.1.5.1 VARV

El origen de VARV tiene una gran controversia, algunos autores dicen que se origina hace 10.000 años en el norte de África y se expande por medio de comerciantes egipcios hasta la India (Riedel, 2005), otros que su ancestro fue un virus relacionado a CPXV del que diverge emergiendo hace 3.000-4.000 años en el este de África al introducir los camellos y propiciado por cambios climáticos (Babkin and Babkina, 2015). La momia del faraón egipcio, Ramses V (1.157 antes de Cristo) presenta lesiones en la piel características de la viruela (Fenner, F., 1988; Hopkins, D.R., 2002). La viruela es altamente contagiosa y tiene una alta mortalidad. VARV tiene al humano como su único hospedador y ha protagonizado epidemias provocando

millones de muertes a lo largo de la historia de la humanidad (Fenner, F., 1988; Moss, B., *In Fields Virology*, 5th ed.). En el siglo XVIII, se introduce en Europa la variolización que ya era común en África, India y China. En 1796, Edward Jenner utilizó la pústula de una mujer infectada por CPXV para inmunizar a gente sana frente a la viruela. Es en 1840, cuando se prohíbe la variolización y se hace genérica la vacunación de Jenner (Riedel, 2005). En 1967, la viruela, causaba en el mundo de 10-15 millones de casos de enfermedad y 2 millones de muertes al año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) dio por erradicada la enfermedad en 1980 por medio de una vacunación masiva (Fenner, 1993). Actualmente existen dos reductos de VARV conservados en laboratorios de bioseguridad nivel 4, uno en el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (Center for Disease Control and Prevention, CDC) de Atlanta, Georgia, USA y otro en el Centro de Investigación Estatal de Virología y Biotecnología (State Research Center of Virology and Biotechnology, VECTOR) en Koltsovo, Rusia. La OMS ha decidido destruir las últimas muestras infecciosas de VARV, pero esta decisión se ha retrasado por la necesidad de disponer de vacunas y fármacos anti-virales para combatir posibles re-emergencias del virus como resultado de la liberación de virus no declarados o un ataque bioterrorista (Smith and McFadden, 2002).

1.1.5.2 1.5.2. MPXV, VACV y CPXV

MPXV infecta primates y humanos. Es el OPXV más peligroso tras la viruela, siendo un riesgo para las personas inmunodeprimidas. El reservorio animal se encuentra en roedores de la selva tropical de África. El primer caso descrito fue en un mono de un zoológico de Copenhagen en 1957, se han descrito brotes en distintos zoológicos desde entonces en América y Europa. La primera infección humana descrita data de 1970 en África occidental y central, este brote tuvo una mortalidad de 10-17% (Essbauer et al., 2010). Se han sucedido más brotes humanos desde entonces en Zaire (1980-1984) (Jezek et al., 1986) y en la República Democrática del Congo (Essbauer et al., 2010; Rimoïn et al., 2010). En 2003 llega a USA una cepa atenuada, sin causar mortalidad (Reed et al., 2004).

VACV es el virus que se utilizó en la campaña de vacunación masiva para erradicar la viruela. No se conoce su reservorio natural, tiene origen desconocido y un amplio rango de hospedador (Alcami and Smith, 1996; Baxby, 1981; Essbauer et al., 2010). Se cree endémico en Brasil (Essbauer et al., 2010). Hoy en día se está desarrollando como vector para genes foráneos (Smith and Moss, 1983) en la generación de vacunas frente a enfermedades como la rabia o la tuberculosis (Essbauer et al., 2010). La cepa *Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA) está muy atenuada y se está generando como vacuna de tercera generación (Mayr and Danner, 1978) contra, por ejemplo, tumores (Gomez et al., 2008) y contra el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Esteban, 2009; Garcia-Arriaza et al., 2010).

CPXV tiene un amplio rango de hospedador, infectando gatos, elefantes, vacas, ratas, humanos, caballos, etc. (Chantrey et al., 1999), aunque no es común que se transmita entre humanos ni entre gatos (Essbauer et al., 2010). Su reservorio natural son los roedores (Chantrey et al., 1999). CPXV es uno de los virus más complejos al poseer el mayor número de genes entre los OPXV (Essbauer et al., 2010). En EEUU a los animales de zoológico se les vacuna con MVA. Ha habido casos de contagio a personas inmunodeprimidas por sus gatos con desenlace mortal, y también casos de contagio de ratas a humanos. Se ha descrito

recientemente un caso de una persona infectada por un virus que parece resultar de una recombinación entre CPXV y el virus ectromelia (ECTV) (Okeke et al., 2012).

1.1.5.3 ECTV

ECTV es el agente causal de *mousepox*, una enfermedad parecida a la viruela pero específica de ratones. Se describe por primera vez en Inglaterra (1930) en ratones de laboratorio como una enfermedad sistémica con lesiones graves en hígado, bazo y que podía derivar en la pérdida de la pata posterior, este último hecho y su carácter infeccioso dio nombre a la enfermedad *infectious ectromelia* (Marchal, J. 1930). En ratones susceptibles, la enfermedad puede cursar con hepatitis aguda y alta mortalidad, los animales supervivientes desarrollan pústulas en la piel que dejarán unas marcas características de la enfermedad similares a la viruela. Se cree que los ratones de campo son el reservorio natural del virus y que es fácilmente transmisible entre ellos (Fenner, 1981). La primera cepa aislada fue ECTV Hampstead (Marchal, J. 1930) y la cepa más virulenta es ECTV Moscow (Andrewes and Elford, 1947). ECTV Naval se aisló de un brote de ratones de experimentación en USA, letal para BALB/c y con baja virulencia y mortalidad, sin embargo, para los ratones CD-1 (Dick et al., 1996). Los genomas completos de ECTV Moscow (Chen et al., 2003) y Naval (Mavian et al., 2014) se han secuenciado. Las similitudes genéticas y consecuencias de la enfermedad entre ECTV y VARV hacen del primero un modelo muy apropiado para el estudio de la patogénesis viral, respuesta del sistema inmunitario y mecanismos de evasión del sistema inmune. El uso de ratones en la experimentación le hace ser un modelo accesible (Esteban and Buller, 2005).

1.2 MODULACIÓN INMUNOLÓGICA POR POXVIRUS

Los poxvirus son virus de gran tamaño que han dedicado buena parte de su información genética a evadir y modular el sistema inmunitario del hospedador (Finlay and McFadden, 2006; Seet et al., 2003a). Algunas de las estrategias empleadas en la interacción con el sistema inmune es la expresión de proteínas que unen o inhiben el sistema de citoquinas, quimoquinas, el sistema del complemento, la apoptosis, la señalización del interferón (IFN) y el factor de necrosis tumoral (TNF) entre otras (Alcami, 2003; Smith et al., 2013).

1.2.1 Sistema complemento y citoquinas interleuquina-1 (IL-1) e IL-18

La proteína de control al complemento de poxvirus inhibe las vías clásica y alternativa del complemento (Kotwal and Moss, 1988; McKenzie et al., 1992) y es un factor de virulencia. Se ha demostrado *in vivo* que su delección provoca más síntomas de enfermedad que el virus parental (Isaacs et al., 1992; Miller et al., 1997).

Los OPXV secretan un receptor soluble de IL-1 β (vIL-1 β R) que une específicamente la citoquina e impide su unión con el receptor celular en linfocitos T (LT). Un VACV mutante que no expresa vIL-1 β R acelera los síntomas de la enfermedad y la mortalidad en ratones (Alcami and Smith, 1992, 1996; Spriggs et al., 1992).

La proteína de unión a IL18 (vIL18BP) de poxvirus inhibe la expresión de IFN γ y se ha descrito como un importante factor de virulencia (Born et al., 2000; Smith and Alcamí, 2000).

1.2.2 TNF

Los TNFs son una familia de citoquinas que activan un estado antiviral en las células no infectadas, citolisis y apoptosis en las células infectadas, y reclutamiento de linfocitos al foco de infección (Locksley et al., 2001). El TNF se une a receptores específicos, TNFR I y TNFR II. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son reconocidos por los receptores de tipo *Toll* (TLRs). Los TLRs tienen un papel muy relevante en la protección frente a infecciones, reconocen distintos tipos de ácidos nucleico y se encuentran en la membrana plasmática a excepción de TLR9 que es endosomal. Los TLRs activan cascadas de señalización vía factor nuclear κ B (NF κ B) que se transloca al núcleo activando la expresión de IFN I, TNF y genes pro-apoptóticos como la caspasa 8. Los OPXV impiden la acción del TNF por varias vías: uniendo directamente o inhibiendo la acción del TNF- α , linfotóxina- α , NF κ B, caspasa-8 y granzima B (GzB) (Alzhanova and Fruh, 2010).

CP77 de OPXV induce la degradación de NF κ B e interfiere su translocación al núcleo (Chang et al., 2009). Otras proteínas de inhibición de NF κ B, el producto del gen 006 de CPXV, han sido analizadas en experimentos *in vivo* y han concluido que el mutante de CPXV que no expresa esta proteína tiene una respuesta inflamatoria aumentada respecto del parental (Alzhanova and Fruh, 2010; Mohamed et al., 2009), el ortólogo en ECTV (antes 002 y ahora 003) también ha sido caracterizado *in vivo* (Rubio et al., 2013). La proteína modificadora de la respuesta de citoquinas A (CrmA) impide la acción de la caspasa-8 y de la GzB inhibiendo la apoptosis de las células infectadas mediada por TNF. Además inhibe la caspasa-1 que es necesaria para la maduración de la IL-1 β e IL-18 (Alzhanova and Fruh, 2010).

Hay cuatro tipos de TNFR virales (vTNFR) en OPXV: CrmB, CrmC, CrmD y CrmE. Guardan homología con los TNFR celulares y poseen un número variable de dominios ricos en cisteínas (CRD) característicos de los TNFRs. Algunas estirpes de VACV expresan CrmE y CrmC (Alcami, 2003), y solamente CPXV expresa todos ellos (Hu et al., 1994). Los vTNFRs presentan propiedades de especificidad de ligando diferentes, sugiriendo una evolución de protección especie-específica con su hospedador. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se comparan las propiedades de unión e inhibición de estos cuatro vTNFRs (Pontejo et al., 2015). ECTV y VARV solamente expresan un tipo de vTNFR, CrmD y CrmB respectivamente (Gileva et al., 2006; Hu et al., 1994). Estas dos proteínas bloquean TNF- α y linfotóxina- α (Loparev et al., 1998; Pontejo et al., 2015) y además inhiben la acción de linfotóxina- β . CrmB inhibe de un modo más eficiente el TNF humano y su acción es más potente que el TNFR humano (Gileva et al., 2006; Hu et al., 1994; Pontejo et al., 2015). CrmC y CrmE unen TNF α humano y murino (Alcami et al., 1999; Pontejo et al., 2015; Saraiva and Alcami, 2001; Smith et al., 1996), mientras que CrmE solo inhibe la actividad del TNF humano (Reading et al., 2002; Saraiva and Alcami, 2001). Estas 2 proteínas además son capaces de unir TNF de membrana (Pontejo, et al. 2015. *Poxvirus encoded TNF decoy receptors inhibit the biological activity of transmembrane TNF*. J. Gen. Virol., en prensa). Hay un quinto vTNFR, vCD30, que es homólogo a CD30 celular e impide la interacción con su ligando, CD30L (Panus et al., 2002), además, inhibe la inducción de citoquinas de tipo 1 (Saraiva et al., 2002), sin embargo, su delección *in vivo* no tiene ningún efecto en la patogénesis viral (Alejo et al., 2009).

1.2.3 IFN

Los IFNs son citoquinas antivirales y pro-inflamatorias esenciales en la activación del sistema inmune innato y de la respuesta adaptativa. El IFN I ($\text{INF}\alpha/\beta$) se une al receptor de IFN tipo 1 (IFNRI), el IFN II ($\text{INF}\gamma$) es secretado principalmente por las células asesinas naturales (NK) y linfocitos activados y se une a IFNRII. Cuando los PAMPs interactúan con los TLRs se activan cascadas de señalización intracelular y distintos factores de transcripción induciendo la expresión de genes de IFN, citoquinas y CKs (Alzhanova and Fruh, 2010; Smith et al., 2013). Los poxvirus expresan proteínas que pueden interferir la señal del IFN por varias vías: impidiendo la expresión mediada por los transductores de señalización y activadores de la transcripción 1 y 2 (STAT1/2) o expresando receptores solubles de IFN I e IFN II (vIFNR), entre otros.

La proteína viral de unión a IFN I (B18) no tiene homología con el IFNRI e inhibe la señalización intracelular por el factor de regulación de STAT1/2 (Symons et al., 1995), y además es capaz de unirse a la superficie celular mediada por GAGs (Alcami et al., 2000) mediante residuos independientes de su interacción con IFN (Montanuy et al., 2011). B18 tiene la propiedad de unir e inhibir la señal del IFN en distintas especies. El virus mutante, VACV Δ B18R, está atenuado *in vivo* en un modelo de ratón (Symons et al., 1995). El homólogo de esta proteína en el virus yatapox es capaz de inhibir IFN III también (Huang et al., 2007).

B8 de OPXV es un vIFN γ R con homología al receptor celular que impide la función del IFN γ interfiriendo la interacción con su receptor específico. B8 de CPXV, VACV y el virus camelpox unen IFN γ humano, bovino y de conejo pero no el murino (Alcami and Smith, 1995). El virus mutante que no expresa la proteína B8 está atenuado en un modelo de conejo (Symons et al., 2002) y en el modelo de *mousepox* (Sakala et al., 2007).

1.2.4 CKs

Las CKs son citoquinas quimiotácticas (8-14 kDa) secretadas por células del sistema inmune, endoteliales, epiteliales, fibroblastos o afines. Hay descritos 46 CKs y 18 receptores específicos de CKs (CKRs) diferentes y son del tipo de siete dominios transmembrana acopladas a proteína G (GPCR). Se clasifican como CKs CC, CXC, CX3C o C en función de las cisteínas conservadas en el extremo N-terminal. Las CKs CC y CXC tienen 4 cisteínas conservadas, la 1ª y la 2ª son adyacentes o están separadas por un residuo según sean CC o CXC, respectivamente. Las CKs C y CX3C solamente tienen 2 cisteínas conservadas (Lau et al., 2004a; Zlotnik and Yoshie, 2000; Zlotnik et al., 2006). La secuencia primaria puede variar entre ellas desde menos del 20% hasta un 90% (Fernandez and Lolis, 2002). Las CKs se subdividen funcionalmente en inflamatorias y homeostáticas. Las CKs inflamatorias se expresan como consecuencia de daño tisular o infección por células activadas, siendo responsables de la migración de leucocitos (Lau et al., 2004a; Mellado et al., 2001; Zlotnik et al., 2006). Pueden unirse a varios CKRs o compartir CKR entre ellas, además pueden ser agonistas en un caso y antagonistas en otro. Las CKs CC y CXC inflamatorias además de unirse al GPCR pueden hacerlo con un receptor que no señala al carecer del motivo conservado DRY, como es el caso de DARC (Zlotnik and Yoshie, 2012). Las CKs homeostáticas, sin embargo, se expresan

de modo constitutivo en órganos linfáticos (médula ósea, timo, bazo y ganglios linfáticos) y en la piel. Estas no son promiscuas en cuanto a su interacción con el GPCR, son responsables de la arquitectura de los órganos linfáticos, entrada de los precursores a los órganos linfáticos primarios y de la salida de los linfocitos maduros a los órganos linfáticos secundarios (Lau et al., 2004a; Zlotnik et al., 2006).

La unión específica entre una CK y su CKR tiene como consecuencia la polarización celular, movimiento celular, la respuesta inmune e inflamatoria, diferenciación de LT colaboradores en Th1/Th2, etc. Además también se la relaciona con cáncer (metástasis), hematopoyesis, prevención de entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), enfermedades autoinmunes (asma, artritis reumatoide, transplantes), enfermedades cardiovasculares y neuroinflamatorias (esclerosis múltiple o Alzheimer) (Lau et al., 2004a; Mellado et al., 2001). Las cascadas de señalización intracelular que activan tienen involucradas muchas proteínas: proteínas $G\alpha\beta\gamma$, adenilato ciclasa, fosfolipasa, tirosín kinasas, serín-treonín kinasas, Rho GTPasas y diferentes mensajeros secundarios. También hay vías independientes de la proteína G, como la vía JAK/STAT (Lau et al., 2004a; Mellado et al., 2002; Mellado et al., 2001).

1.2.4.1 Estructura e interacción GPCR-CK

Todas las CKs monoméricas comparten el mismo tipo de plegamiento tridimensional en forma de β -lámina. Tienen un extremo N-terminal largo y muy flexible, tras las 2 primeras cisteínas se encuentra el *loop*-N seguido de una hélice 3_{10} que se continúa con 3 cadenas- β antiparalelas y una α -hélice en el extremo C-terminal. Cada elemento secundario está unido por un *loop*, 30s (3ª cisteína), 40s y 50s (4ª cisteína) (Fig. 3A). El núcleo de la proteína se estabiliza con 2 puentes disulfuro (entre 1ª-3ª y 2ª-4ª cisteínas), a excepción, de las CKs CX3C y C que sólo tienen uno. Aunque la secuencia de aminoácidos no está conservada entre las diferentes CKs, es el extremo N-terminal el que está involucrado en la activación del CKR (Fernandez and Lolis, 2002; Laguri et al., 2008), la secuencia del *loop*-N le confiere especificidad a la interacción con el receptor y es relevante en la unión y activación del GPCR (Hammond et al., 1996; Laguri et al., 2008; Williams et al., 1996; Ye et al., 2000). Los *loops* 30s y 40s también están implicados en la interacción con el GPCR (Beall et al., 1996; Laguri et al., 2008). La tercera cadena- β de CCL5 también se ha descrito implicada en la unión al CKR (Laguri et al., 2008). La α -hélice del extremo C-terminal puede estar implicada en la modulación de la actividad de algunas CKs (Luo et al., 1999). Los GPCRs tienen un dominio extracelular (extremo N-terminal y 3 *loops*), un dominio transmembrana formado por 7 α -hélices y un dominio intracelular (3 *loops* y el extremo C-terminal). Todos tienen el motivo DRYLAIV en el 2ª *loop* extracelular conservado (Mellado et al., 2001). El dominio N-terminal y los *loops* extracelulares están implicados en el reconocimiento y unión al ligando (Fernandez and Lolis, 2002; Laguri et al., 2008; Lau et al., 2004a; Mellado et al., 2001), el extremo C-terminal está implicado en la transducción de la señal intracelular (Mellado et al., 2001). Los CKRs se clasifican como CR, CCR, CXCR o CX3CR según unan CKs, C, CC, CXC o CX3C, respectivamente. La afinidad de unión entre una CK y su CKR está en el rango μ M-nM. La mayoría de las interacciones entre ellos son hidrofóbicas aunque también pueden darse enlaces electrostáticos (Lau et al., 2004a). El modelo de interacción más aceptado entre ligando y CKR es el de 2 pasos seriados, primero, la CK es reconocida y unida a través de su núcleo interaccionando con el extremo

N-terminal del GPCR (Sitio I), el siguiente paso consiste en un cambio conformacional en la CK que sitúa su extremo N-terminal, altamente flexible, hacia las regiones transmembrana del CKR (Sitio II), el GPCR cambia de conformación, se activa, dimeriza y se produce la cascada de señalización intracelular (Blanpain et al., 2003; Kofuku et al., 2009; Laguri et al., 2008). Tras la activación del GPCR la proteína $G\alpha$ iniciará la señalización intracelular que tendrá muchas consecuencias: extravasación, tráfico y degranulación de leucocitos, diferenciación celular (Th1/Th2), maduración de LT y linfocitos B (LB) en distintas etapas del desarrollo, migración de células dendríticas (CD) a tejidos y ganglios linfáticos, entre otros (Fernandez and Lolis, 2002).

1.2.4.2 Transducción de la señal tras activación del GPCR

El cambio conformacional tras la interacción entre la CK y el CKR permite la dimerización del GPCR que será fosforilado en el motivo DRY por las tirosín kinasas JAK y la consiguiente activación de los factores de transcripción STAT que migran al núcleo. La activación de JAK es imprescindible para esta vía de señalización que conlleva la expresión génica, la polarización celular y la quimiotaxis (Mellado et al., 2001).

La proteína $G\alpha_i$ se une a los *loops* intracelulares del CKR, tras la activación del receptor, se disocia de $G\beta\gamma$ y esto provoca distintas cascadas de señalización intracelular independientes con distintos mensajeros secundarios. Las proteínas G participan en rutas de señalización muy variadas que incluyen la fosfolipasa C, las MAPK (proteínas quinasas activadoras de mitógeno) o la kinasa que fosforila en 3' al fosfatidilinositol (PI3K) (Mellado et al., 2001).

Las CKs activan la vía PI3K que está involucrada en adhesión celular (integrinas), migración y polarización celular (regulación del citoesqueleto de actina) (Mellado et al., 2001).

Las serín-treonín kinasas intervienen en desensibilización de los CKRs que se internalizan en endosomas, se degradan o se reciclan en la superficie celular (Mellado et al., 2001).

La unión entre CK y CKR activa también la vía de Ras que conlleva el inicio de la cascada de señalización de las MAPK vía G_i . Mediante esta vía también se activa la fosfolipasa A2. En conjunto las MAPKs y la fosfolipasa A2 regulan cambios en el citoesqueleto que son necesarios para la migración celular aunque no para la quimiotaxis (Mellado et al., 2001).

1.2.4.3 Interacción CKs-GAGs

Los GAGs son polisacáridos no ramificados formados por repetición de unidades de disacáridos que varían en la composición del sacárido, el tipo de enlace, la acetilación y la N- y O-sulfatación. La longitud varía entre 1-25.000 unidades de disacáridos (Proudfoot, 2006). Por su gran heterogeneidad son consideradas las macromoléculas biológicas con mayor diversidad. Pueden ser solubles o estar unidos a la superficie celular por un núcleo proteico formando los proteoglicanos (PG) (Handel et al., 2005; Proudfoot, 2006). El heparán sulfato (HS) es el más ubicuo y representa del 50-90% del total de los PGs del endotelio. Lo expresan todas las células y es el más variable. La heparina (H) y HS, están compuestos por las mismas unidades monoméricas, pero la H está más sulfatada (Handel et al., 2005). última se expresa en mastocitos

principalmente. El condroitín sulfato, el dermatán sulfato y el HS se expresan en la superficie celular y la matriz extracelular. El keratán sulfato es el mayor componente de la córnea y el cartílago; por último, el ácido hialurónico es considerado el pegamento natural en el tejido conectivo (Proudfoot, 2006). A excepción del ácido hialurónico y la H, el resto de GAGs forman PGs (Handel et al., 2005). Los GAGs interaccionan con proteínas y lípidos de membrana; proteasas, citoquinas, CKs, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y receptores de superficie de virus son algunos de sus ligandos (Handel et al., 2005; Proudfoot, 2006). Se les adjudican diversas funciones entre las que destacan el permitir el establecimiento del gradiente quimiotáctico necesario para guiar a los leucocitos al foco de la infección impidiendo la difusión de las CKs en el torrente sanguíneo, la señalización, desarrollo y adhesión celular; proteger frente a la acción de proteasas, servir como lugar de almacenaje proteico evitando la biosíntesis, angiogénesis, proliferación, localización y migración celular (Handel et al., 2005; Laguri et al., 2008).

Hay descritas secuencias consenso de unión a GAGs, XBBXBX y XBBBXXBX donde B es un residuo básico (Cardin and Weintraub, 1989). Las CKs tienen zonas de unión a GAGs que pueden o no coincidir con la zona de unión al CKR. En la mayoría de las CKs CXC esta zona se sitúa en la α -hélice del extremo C-terminal y el *loop* que conecta el extremo N-terminal con la primera cadena- β (Handel et al., 2005; Laguri et al., 2008). En CXCL12 la zona de unión a GAGs se sitúa en la primera cadena- β de la lámina- β (Amara et al., 1999; Laguri et al., 2008). En las CKs CC la región de unión a GAGs se localiza en el *loop* 40s con el motivo BBXB conservado (Laguri et al., 2008; Proudfoot, 2006). Por último en CX3C los residuos implicados en esta interacción electrostática se sitúan en los *loops* que conectan las cadenas- β 1-2 y la cadena- β 3 y la α -hélice (Laguri et al., 2008). Las CKs son proteínas muy básicas en su mayoría y los GAGs son moléculas muy electronegativas, por este motivo se asume que la interacción tiene un carácter electrostático aunque hay evidencias que sitúan esta interacción en el marco de la especificidad. Algunos ejemplos son las CKs CCL3 y CCL4, que tienen un pI \sim 4.48 y sin embargo, se unen a GAGs. Por otro lado, se han identificado secuencias específicas de unión a CKs en HS o el hecho de que las CKs tienen diferentes afinidades hacia los distintos GAGs (Kuschert et al., 1999; Lau et al., 2004b; Patel et al., 2001). La distribución de epítomos de unión a GAGs en la CK, la estructura y el patrón de sulfatación de los sacáridos en los GAGs y la presentación de diferentes epítomos de unión a GAGs en las CKs según su estructura cuaternaria son variables que le aportan especificidad a dicha interacción (Handel et al., 2005; Laguri et al., 2008).

Se ha demostrado que las CKs unen GAGs *in vitro* (Hoogewerf et al., 1997; Kuschert et al., 1999; Lau et al., 2004b; Patel et al., 2001) e *in vivo* (Lau et al., 2004b; Middleton et al., 1997; Rot, 1993). CKs mutantes que no unen GAGs son capaces de inducir la migración celular *in vitro* pero no *in vivo* (Proudfoot et al., 2003) probablemente porque sin la unión a la superficie del endotelio por medio de GAGs, se difuminan en el torrente sanguíneo y no son capaces de generar un gradiente de concentración (Proudfoot, 2006). Por otro lado, en experimentos *in vitro* se demostró que las CKs oligomerizan en presencia de GAGs (Fernandez and Lolis, 2002; Hoogewerf et al., 1997; Lau et al., 2004b; Proudfoot et al., 2003), se generaron mutantes monoméricas que *in vitro* fueron capaces de inducir quimiotaxis celular (Kim et al., 2001; Laurence et al.,

2000; Paavola et al., 1998; Rajarathnam et al., 1994) pero nuevamente fallaban en esta función *in vivo*, destacando la relevancia de la oligomerización y que esta sólo puede darse mediante la interacción con GAGs (Proudfoot et al., 2003). Además se postula que los complejos CK-GAG podrían activar transducción de señales independientes de la interacción de CK-GPCR (Handel et al., 2005).

1.2.5 vCKBPs

Uno de los mecanismos de evasión del sistema inmune por parte de los virus es sabotear el sistema de CKs. Para ello los virus han desarrollado durante la evolución varias estrategias, como secretar homólogos de CKs, homólogos de CKRs (receptor de CK) o vCKBPs, que son proteínas virales secretadas sin homología con receptores ecelulares capaces de unir CKs.

En las familias herpesvirus y poxvirus es dónde se descubrieron las vCKBPs, pero también se han descrito en el tremátodo *Schistosoma mansoni*, en garrapatas, y más recientemente, en humanos. Hay diferentes estrategias por las que pueden interferir la actividad de las CKs. Por un lado, pueden impedir su interacción con el GPCR, y por otro, inhibir la interacción con GAGs eliminando la posibilidad de la formación del gradiente quimiotáctico. Por último, además de interaccionar con las CKs pueden unirse ellas mismas a GAGs simultáneamente (Heidarieh et al., 2015) (Fig. 3).

1.2.5.1 35-kDa

La proteína 35-kDa se expresa en muchos poxvirus que incluyen a VARV, CPXV, ECTV y virus mixoma (MYXV) (Burns et al., 2002). Se describió por primera vez en VACV como una vCKBP que une CKs CC (Alcami et al., 1998; Graham et al., 1997; Smith et al., 1997). Une con alta afinidad la mayoría de las CKs CC humanas y murinas (Burns et al., 2002). El mecanismo de acción de esta CKBP es interrumpir la interacción CK-GPCR, de modo que inhibe la transducción de señales y la migración celular *in vitro* (Alcami et al., 1998; Lalani et al., 1998; Smith et al., 1997) (Fig. 3B). Además, la 35-kDa de MYXV, M-T1, puede unirse simultáneamente a GAGs (Seet et al., 2001b) (Fig. 3C). La estructura tridimensional tiene una forma característica de β -sándwich con 2 láminas- β antiparalelas, 2 α -hélices pequeñas y largos *loops* que conectan los elementos secundarios (Carfi et al., 1999) (Fig. 4C). También se ha resuelto la estructura tridimensional de complejos 35-kDa/CKs, identificando el dominio de unión a CKs en la lámina- β II que interacciona con el N-terminal y los *loops* 20s y 40s de las CKs (Kuo et al., 2014; Zhang et al., 2006a).

Análisis mutacionales han reiterado estos mismos resultados añadiendo además residuos situados en el *loop* 2-4 (Arnold and Fremont, 2006). Para conocer el papel en la patogénesis viral, se han construido virus mutantes delecionados en el gen *35-kDa* de MYXV y de VACV rabbitpox, infectando conejos y ratones, respectivamente. Han observado que no hubo cambios significativos en la progresión de la enfermedad, ni en mortalidad, pero sí, se apreció un aumento de la infiltración de leucocitos a 2-3 dpi (Lalani et al., 1999) o que los síntomas de la enfermedad aparecían antes y que estos eran más severos en dosis sub-letales, comparada con el virus parental (Martinez-Pomares et al., 1995). La inserción de este gen en el genoma de VACV WR, que no expresa dicha proteína, causa una disminución de la inmunopatología

(Reading et al., 2003). Además, se ha estudiado el uso de la proteína 35-kDa como anti-inflamatorio en enfermedades de carácter auto-inmune (Buatois et al., 2010; Bursill et al., 2009; White et al., 2011).

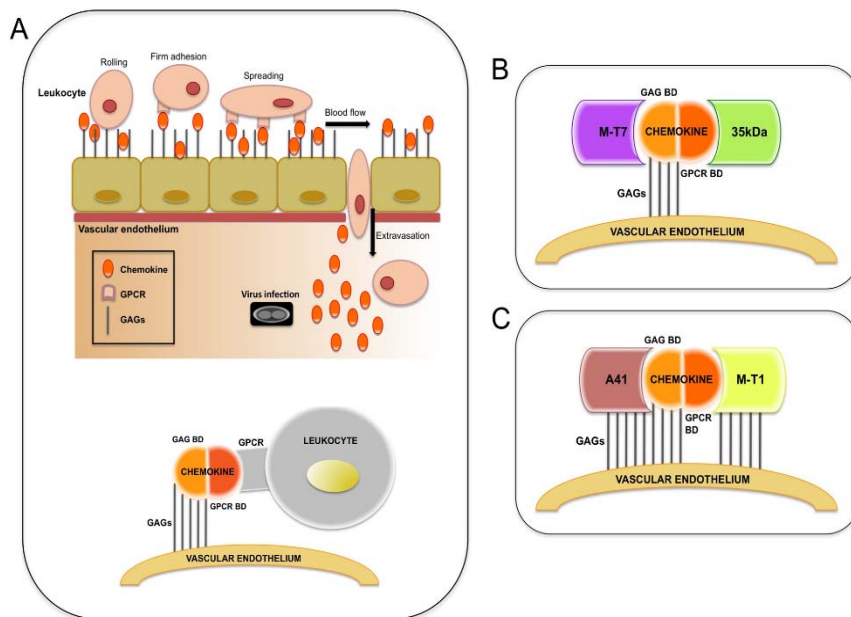


Figura 3. Diferentes mecanismos de interacción entre vCKBPs y CKs. A) Los leucocitos son reclutados al tejido inflamado siguiendo un gradiente quimiotáctico de CKs presentadas sobre los GAGs del endotelio vascular. Mediante interacciones de baja afinidad los leucocitos ruedan sobre la superficie celular. Finalmente, mediante interacciones de alta afinidad entre las CKs y los GPCRs se desencadenan una serie de cascadas intracelulares que permiten la extravasación de las células al foco de infección. B) Las vCKBPs pueden unirse a las CKs por el dominio de unión a GAGs (GAG BD) o por el dominio de unión al GPCR (GPCR BD) de estas. C) Las vCKBPs además de interaccionar con las CKs podrían unirse simultáneamente a los GAGs quedando ancladas a la superficie celular.

1.2.5.2 A41

A41 de VACV es una proteína inmunomoduladora de expresión temprana y tardía durante la infección y está muy conservada entre los distintos miembros de poxvirus. La glicoproteína A41 guarda cierta similitud de secuencia con la proteína 35-kDa de VACV y otros poxvirus (Ng et al., 2001). Estudios de interacción proteína-proteína realizados por resonancia de plasmón superficial (SPR) han demostrado que las proteínas A41 de VACV y E163 de ECTV, ortólogas, unen con gran afinidad un grupo reducido de CKs CC y CXC (Bahar et al., 2008; Ruiz-Arguello et al., 2008).

A diferencia de la proteína 35-kDa, la interacción entre A41 y las CKs se inhibe en presencia de GAGs y además, A41 no es capaz de inhibir la quimiotaxis celular en ensayos *in vitro*. Usando formas mutadas de CXCL10 y CXCL12 incapaces de unirse al CKR o a GAGs, se concluyó que E163 interacciona con las CKs por el dominio de unión a GAGs (Ruiz-Arguello et al., 2008) (Fig. 3C). Se ha propuesto que la acción inhibitoria de A41 consiste en impedir la interacción entre CKs y GAGs, imposibilitando la formación del gradiente quimiotáctico que es necesaria para un correcto papel de las CKs en la quimiotaxis *in vivo* (Handel et al., 2005; Johnson et al., 2005). Además de la interacción a CKs, E163 de ECTV es capaz de unirse ella misma a GAGs con alta afinidad, consiguiendo un efecto local concentrado en el mismo foco de la infección (Ruiz-Arguello et al., 2008). A pesar de tener una homología de secuencia de sólo ~ 20% con 35-kDa, comparten la misma estructura tridimensional en forma de β -sándwich aunque hay diferencias en la distribución electrostática de cargas y en los *loops* (Bahar et al., 2008) (Fig. 4C). El *loop* altamente ácido que une las cadenas- β 2 y 4 presente en 35-kDa está ausente en A41 y quizá es responsable de la restricción de selectividad de unión a un grupo más reducido de CKs. Aunque no se ha resuelto la estructura

tridimensional del complejo A41/CK, se cree por modelado estructural que dicha interacción implica el mismo dominio que en 35-kDa (Bahar et al., 2008). Aunque A41 y 35-kDa comparten estructura tridimensional, el mecanismo de acción para bloquear el sistema de CKs es distinto pero complementario, lo cual es una ventaja para el control de la respuesta antiviral del hospedador. La delección del gen *A41L* en VACV WR provoca un aumento en el tamaño de las lesiones y una respuesta inflamatoria aumentada en un modelo murino de piel (Ng et al., 2001). Este virus mutante es más virulento que el parental en una infección intranasal (IN) en las dosis de infección más bajas (Clark et al., 2006). La delección del gen *A41L* de VACV MVA induce una mejor protección que el parental frente a una infección letal con VACV WR (Clark et al., 2006), este mismo virus pero expresando IL-1 β R (B163R) induce una respuesta adaptativa y de memoria más eficaz frente a VIH-1 (Garcia-Arriaza et al., 2010).

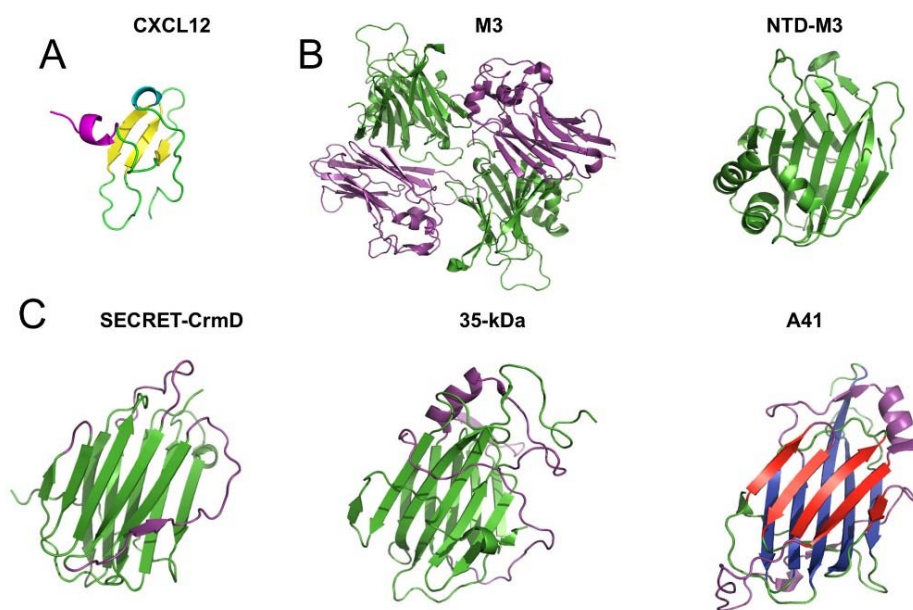


Figura 4. Estructura de vCKBPs. A) Estructura de la CK CXCL12 (PDB:1A15) (Dealwisetal.,1998). Las 3 cadenas β antiparalelas se muestran en amarillo, la hélice 3₁₀ se representa en azul y la α -hélice C-terminal se representa en magenta. B) Estructura de la proteína M3 (PDB: 1MKF). El dominio C-terminal se muestra en magenta y el dominio N-terminal (NTD) en verde. C) Estructura del dominio SECRET de CrmD (PDB: 3ON9), de 35-kDa (PDB: 1CQ3) y A41 (PDB: 2VGA). Las 3 vCKBPs tienen el mismo plegamiento en forma de β -sándwich pero los *loops* (magenta) son diferentes entre ellos. En A41 destacamos en rojo la lámina- β II y en azul la lámina- β I. Figura adaptada de Heidarieh H., et al., 2015.

1.2.5.3 M-T7 de MYXV

La glicoproteína secretada M-T7 tiene homología de secuencia al IFNR de humanos y ratones, una e inhibe la actividad de IFN de conejo de manera especie específica (Mossman et al., 1995; Upton et al., 1992). Además, une un amplio rango de CKs C, CC y CXC. Por análisis mutacional con CXCL8 se propuso que M-T7 interacciona con el dominio de unión a GAGs de las CKs (Lalani et al., 1997) (Fig. 2B), este hecho es sorprendente porque los ortólogos codificados en VACV o CPXV no unen CKs (Alcami et al., 1998; Lalani et al., 1997; Ruiz-Arguello et al., 2008). Se generó un MYXV delecionado en ambas copias del gen *M-T7*, con el que se infectaron conejos europeos, y se concluyó que M-T7 es un importante factor de

virulencia. Además, también había diferencias en el tamaño y progresión de las lesiones en la piel comparado con el virus parental (Mossman et al., 1996). Es difícil concluir en este caso si el efecto observado en la virulencia es debido a la pérdida de unión a IFN o a CKs, o la suma de ambas.

1.2.5.4 Familia de proteínas de poxvirus que contienen el dominio SECRET

La proteína CrmB de VARV es uno de los cuatro TNFR homólogos codificados por poxvirus. El extremo N-terminal de estos vTNFRs está compuesto por CRDs con homología a los receptores de mamíferos y que interactúan con TNF (Hu et al., 1994; Loparev et al., 1998; Saraiva and Alcami, 2001; Smith et al., 1996). Los únicos vTNFRs codificados por VARV (CrmB) y ECTV (CrmD), tienen un extremo C-terminal adicional llamado dominio SECRET (*smallpox virus encoded chemokine receptor*) que no tiene homología con la proteína del hospedador. Análisis de unión realizados por resonancia de plasmón superficial (SPR) con todas las CKs humanas y murinas mostraron que CrmB se une con alta afinidad a un grupo reducido de CKs. Las proteínas V218 de CPXV-BR, E12 y E184 de ECTV, son proteínas que contienen el dominio SECRET (SCP) y se denominan SCP-1, 2 y 3, respectivamente (Alejo et al., 2006). Todos los miembros de la familia SECRET unen el mismo grupo de CKs y se ha demostrado que CrmB de VARV y CPXV, CrmD de ECTV y SCP-1 de CPXV son capaces de inhibir la migración celular *in vitro*, sugiriendo que se unen al dominio de unión del GPCR de la CK. La estructura tridimensional del dominio SECRET ha revelado que tiene similitud estructural con las vCKBPs A41 y 35-kDa. Se trata de nuevo de un plegamiento en forma de β -sándwich (Antonets et al., 2010; Xue et al., 2011) (Fig. 4C) y se ha resuelto también acoplada con CX3CL1, por la que tiene una baja afinidad (Xue et al., 2011). La delección del gen *SCP B7* de VACV WR no causó un cambio de fenotipo en la enfermedad respecto del virus parental aunque en una infección intradermal murina las lesiones provocadas por el virus mutante fueron menores que en el parental (Price et al., 2000). La delección del gen *CrmB* en CPXV demostró un efecto anti-inflamatorio *in vivo* y un aumento en la dosis letal 50 (DL₅₀) en ratones infectados (Palumbo et al., 1994). La proteína M-T2 de MYXV es otro vTNFR con dominio SECRET, en estudios con conejos europeos infectados por un virus mutante que no expresaba M-T2 observaron una reducción de la virulencia comparada con el parental (Upton et al., 1991). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha demostrado el papel independiente del dominio SECRET o el dominio de unión a TNF.

1.2.5.5 M3 de gamma-herpesvirus 68 (MHV-68)

MHV-68 es un patógeno de roedores salvajes, secreta la vCKBP M3 que une con alta afinidad un amplio espectro de CKs de todas las clases, humanas y murinas (Parry et al., 2000; van Berkel et al., 2000). M3 se une a las CKs por el dominio de unión al CKR pero además también es capaz de interrumpir la interacción entre las CKs y GAGs impidiendo la formación del gradiente quimotáctico (Webb et al., 2004). La estructura tridimensional de M3 fue resuelta en complejo con CCL2 y XCL1 y la forma activa está descrita como un dímero. Curiosamente, el dominio del extremo N-terminal tiene una estructura tridimensional homóloga a 35-kDa, A41 y el dominio SECRET (Fig. 4B). El extremo C-terminal encaja con los residuos conservados en las CKs de unión al CKR (Alexander et al., 2002; Webb et al., 2003). Distintos estudios *in vivo* con el virus mutante delecionado en el gen *M3* de MHV-68, han dado resultados muy diversos. En un

primer trabajo con ratones C57BL/6 (B6) vieron que fallaba en el establecimiento de la latencia (Bridgeman et al., 2001), en otro trabajo en el que infectan vía intracraneal, se comportó como un virus atenuado en CD-1 y B6 pero no en una infección IN (van Berkel et al., 2002). Por último, otros vieron que infectando ratones de campo se reducía significativamente la capacidad de latencia (Hughes et al., 2011).

1.2.5.6 Glicoproteína G (gG) de alfa-herpesvirus

gG es una glicoproteína de membrana de alfa-herpesvirus que tras un corte proteolítico, se vierte en forma secretada al medio (SgG). La actividad CKBP se observó en el sobrenadante (SN) de células infectadas por distintos alfa-herpesvirus (herpesvirus equino 1, herpesvirus bovino 1 y 5, herpesvirus felino 1 y virus de la pseudorabia) (Bryant et al., 2003; Costes et al., 2005; Van de Walle et al., 2007; Viejo-Borbolla et al., 2010). SgGs de HSV-1 y HSV-2 se unen con gran afinidad a CKs CC y CXC a través del dominio de unión a GAGs de la CK (Viejo-Borbolla et al., 2012). Mientras que gGs de otros alfa-herpesvirus inhiben la acción de las CKs o la quimiotaxis (Costes et al., 2005; Van de Walle et al., 2007; Viejo-Borbolla et al., 2010), se ha descrito que la SgG de HSV-1 y HSV-2 potencian la función de las CKs. SgG aumenta la migración celular inducida por CXCL12 β y además, potencia la quimiotaxis celular con CCL28 en un modelo murino *in vivo* (Viejo-Borbolla et al., 2012). El mecanismo de acción descrito para gG de HSV-1 y HSV-2 es la modulación del tráfico y la oligomerización del CKR (Martinez-Martin et al., 2015). Recientemente se ha descrito la capacidad de gG de HSV-2 para modificar la señalización entre el factor de crecimiento nervioso y la quinasas relacionadas con tropomiosina A atrayendo las terminaciones nerviosas hacia el foco de infección (Cabrera et al., 2015).

El virus mutante de HSV-1 sin el gen gG se ha ensayado *in vivo* en tres diferentes estudios (Balan et al., 1994; Meignier et al., 1988; Weber et al., 1987). Se han registrado distintos grados de atenuación sugiriendo su papel en la patogénesis viral. En una infección en cerdos con el virus de la pseudorabia deletado en el gen gG, no hubo variación de la virulencia o inmunogenicidad (Kimman et al., 1992; Thomsen et al., 1987).

1.2.5.7 vCKBP de virus orf (ORFV), pUL21.5 de citomegalovirus humano y R17 de herpesvirus Perú

La vCKBP del poxvirus ORFV une CKs CC y la CK C, linfotactina, mostrando un amplio rango de especificidad de unión (Seet et al., 2003b). Se ha demostrado que es capaz de inhibir la quimiotaxis celular *in vitro* (Lateef et al., 2009; Lateef et al., 2010) uniéndose a las CKs a través del dominio de unión al GPCR (Seet et al., 2003b). En diferentes estudios *in vivo* se ha observado que es un potente inhibidor del reclutamiento de monocitos (Lateef et al., 2009), y CD4 y de la respuesta de LT (Lateef et al., 2010).

pUL21.5 de citomegalovirus humano une y bloquea de un modo específico CCL5 humano evitando la interacción entre la CK y su CKR. Se sugiere que pueda unir otras CKs debido a la limitación en el número de CKs utilizadas en el análisis (Wang et al., 2004).

R17 de herpesvirus Perú es una vCKBP que une CKs CC y C con alta afinidad bloqueando la señalización celular a través de su receptor celular. Además, R17 es capaz de unirse simultáneamente a la superficie celular mediada por GAGs como parte de su mecanismo de acción (Lubman et al., 2014).

1.2.5.8 CKBPs no virales

La CKBP secretada por el parásito tremátodo *Schistosoma mansoni* se expresa únicamente en los huevos del parásito y se observó que une CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 y CX3CL1, interfiriendo la interacción con sus CKRs. Esta CKBP modula el reclutamiento de leucocitos y el tamaño de los granulomas de los huevos. Se sugiere una función en la propagación del trematodo y en la formación del granuloma (Smith et al., 2005).

Las evasinas son CKBPs de garrapatas y comprenden una familia de tres proteínas que son secretadas por las glándulas salivares del parásito. Se postula que tienen una función moduladora de la inflamación. Evasina-1 y Evasina-3 tienen una especificidad de ligando restringida mientras que la Evasina-4 une la mayoría de CKs CC. Las evasinas inhiben la función de la CK uniéndose a estas por el dominio de unión al GPCR (Deruaz et al., 2008; Frauenschuh et al., 2007).

Recientemente se ha descubierto la primera CKBP humana llamada *TNF-stimulated gene/protein-6*. Esta proteína es capaz de inhibir la migración transendotelial de neutrófilos y se ha demostrado que interacciona con CXCL8 a través del dominio de unión a GAGs de la CK evitando el transporte a través de una monocapa endotelial, además también es capaz de interaccionar ella misma con GAGs (Dyer et al., 2014).

1.3 MODELO MOUSEPOX

ECTV se identificó por primera vez en ratones de laboratorio en 1930 y se cree que la infección procedía de ratones de campo y que es muy transmisible entre la población (Esteban and Buller, 2005; Fenner, 1981). *Mousepox* es una enfermedad sistémica y los ratones que sobreviven a ella presentan pústulas en la piel, lo que le hace similar a la viruela. ECTV y VARV tienen similitudes genéticas, poseen un único hospedador, el hombre en VARV y el ratón en ECTV, es por ello que *mousepox* es utilizado como modelo murino de viruela (Esteban and Buller, 2005). *Mousepox* es uno de los modelos animales mejor conocidos y que ha puesto de manifiesto relevantes aspectos en patogénesis viral, respuesta inmune del hospedador (Karupiah et al., 1993), mecanismos de evasión del sistema inmune (Alcami, 2003) y en investigación con antivirales y vacunas para OPXV (Buller et al., 2004). La vía natural de infección es por medio de microabrasiones en la piel, en el laboratorio la vía de infección mediante inyecciones subcutáneas en la almohadilla plantar de la pata (FP) imita la infección natural (Marchal, 1930; Fenner, 1981). También pueden infectarse por medio de aerosoles, pero parece ser que en la naturaleza es una vía de entrada muy poco frecuente. En sucesos de canibalismo, la vía oral es otra ruta de infección (Buller and Palumbo, 1991). La transmisión tiene lugar principalmente por medio de excreciones de animales infectados (heces, orina, etc.) (Marchal, 1930; Fenner, 1981). En experimentos de transmisión se ha visto que el virus es infeccioso de 6-21 días post-infección (dpi) aunque varía según la cepa viral. Hay cepas de ratones que son susceptibles a ECTV, BALB/c, A/J y DBA/2, sin embargo, B6 o AKR son cepas resistentes (Buller and Palumbo, 1991).

El virus infecta por medio de una herida en la piel y replica en la epidermis, la progenie se expande a los ganglios linfáticos desde donde saldrá al torrente sanguíneo provocando la primera viremia, desde allí infecta bazo e hígado (4 dpi) (Fig. 5). La progenie vuelve a dispersarse por el torrente sanguíneo, dando lugar a la segunda viremia y afectando a todo el organismo de un modo sistémico. Las patas se inflaman y las pústulas en la piel pasan a ser ulcerosas finalmente (Esteban and Buller, 2005). El periodo de incubación de la enfermedad es de 0-7 días (d) y el desarrollo de la misma 7-14 dpi, aunque siempre dependerá de la cepa de ratón empleada, la estirpe de virus, etc.

Tras la infección por FP en un ratón susceptible, a las 8 horas post-infección (hpi), ECTV ya se detecta en los ganglios linfáticos, desde allí pasa al torrente sanguíneo, médula ósea, bazo e hígado a los 3-4 dpi. La viremia persiste hasta 13 dpi. En la piel, infecta rápidamente la epidermis con la consecuente aparición de las pústulas. Los Ab se detectan a 7 dpi alcanzando su pico a 14 dpi que se correlaciona con la disminución de virus en tejidos e infectividad (Buller and Palumbo, 1991).

En una infección intranasal (IN) se observan lesiones pulmonares, primero infecta macrófagos alveolares o mucosas del tracto respiratorio inferior o superior y después de 3 dpi se detecta en macrófagos de los ganglios linfáticos. El virus será expulsado por la nariz a partir de 3 dpi y regularmente a partir de 6 dpi. La lesión inicial de la pata puede provocar la pérdida del órgano y, en ocasiones, pueden darse lesiones similares en la cola y la boca. La muerte siempre conlleva lesiones severas en el bazo e hígado. La infección inicial sucede con muy pocas partículas virales, a las pocas hpi se detecta la presencia del virus en las células de los ganglios linfáticos (endoteliales, macrófagos y linfocitos), el ADN viral se detecta de 2-5 hpi (Fenner and Buller, 1997).

1.3.1 Respuesta inmune frente a ECTV

1.3.1.1 Respuesta inmune innata

La resistencia a *mousepox* de la cepa B6 es debida principalmente a la respuesta NK y de LT CD8+ citotóxicos (LTc) más vigorosa y rápida que en las cepas susceptibles. Se han identificado cuatro genes responsables de la resistencia a *mousepox* (*rmp*), *rmp1-4*. *Rmp1* situado en el complejo de genes NK del cromosoma 6 codifica el receptor activador NK1.1 (Brownstein and Gras, 1997) y aunque en un principio se pensó que era esencial en la resistencia frente a *mousepox*, más tarde se observó que no era así (Fang et al., 2008). *Rmp2* contiene genes del complemento como C5 y *rmp3* está vinculado al MHC-I (Esteban and Buller, 2005).

El gen *rmp4* se sitúa en el complejo genómico de las selectinas del cromosoma 1 que se expresan en leucocitos diferenciados contribuyendo al reclutamiento celular (Brownstein and Gras, 1997).

Otro gen de resistencia a *mousepox* es la óxido nítrico sintasa que se induce por citoquinas y su ausencia induce un aumento de la susceptibilidad a la enfermedad aún en presencia de una respuesta normal mediada por IFN γ (Karupiah et al., 1998).

Las células NK tienen un papel fundamental frente a la infección por ECTV (Delano and Brownstein, 1995; Jacoby et al., 1989; Parker et al., 2007). Es la primera línea de defensa previa a la acción de LTc y la

generación de Ab. La activación de estos leucocitos granulados depende de citoquinas como IFN I, IL12, IL18 y de receptores activadores como NKG2D e inhibidores, en la superficie de las células diana (Smith et al., 2013). El gen *NKG2D* presente en B6 pero no en las cepas susceptibles, es esencial en la citotoxicidad de las células NK. La respuesta NK es imprescindible entre 0-4 dpi y se da principalmente en los nódulos linfáticos. El control viral está mediado por la secreción de IFN γ y perforina, también a través del IFN γ regulan la respuesta adaptativa. Se ha comprobado que los LT NK (NKT), sin embargo, no son esenciales en la resistencia a *mousepox* (Parker et al., 2007). Más recientemente, se ha demostrado que la molécula CD94 heterodimeriza con NKG2 formando un receptor de superficie en células NK que es indispensable en el control de la replicación viral y en una respuesta eficiente de LT CD8⁺ en B6 (Fang et al., 2011).

El reconocimiento por parte de TLRs activa una cascada de señalización que juega un papel clave en la infección frente a poxvirus. La maduración de las CDs, células presentadoras de antígeno (APC) por excelencia, conduce a la expresión de IFN I, clave en la activación de la respuesta innata y la adaptativa. En un trabajo reciente, se describe que ECTV es reconocido por TLR9 y que son las CD plasmacitoides las que juegan un papel fundamental en la resistencia a *mousepox* contrariamente a VACV donde se activan vías independientes a TLR9 y también CDs comunes (Samuelsson et al., 2008). En animales KO para macrófagos en B6, la infección de ECTV causó un 100% de mortalidad y la respuesta de LTc fue muy deficiente. Este trabajo pone de manifiesto la relevancia de la acción de los macrófagos para una correcta activación de los LT CD8⁺ (Karupiah et al., 1996).

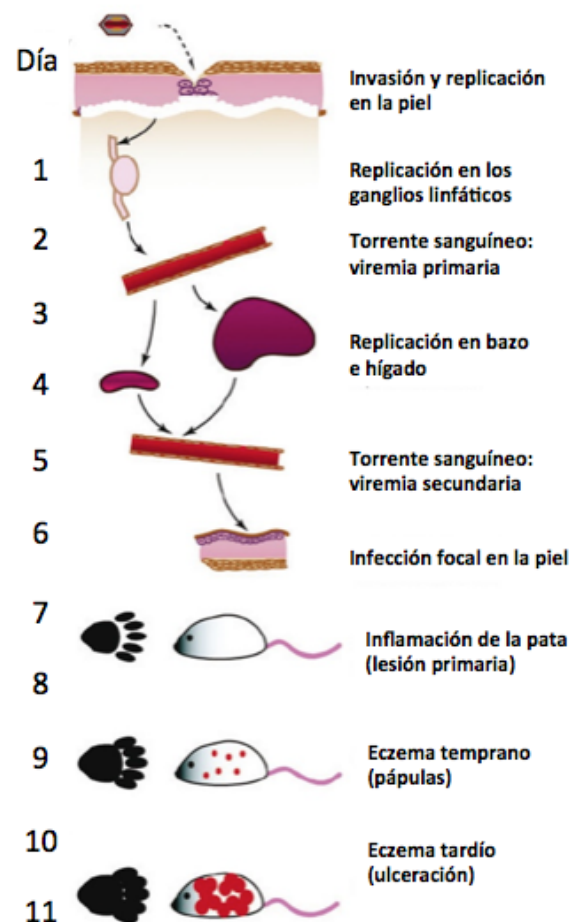


Figura 5. Etapas en el transcurso de una infección por ECTV.
Adaptación de Fenner (1948) en Esteban and Buller, 2005.

1.3.1.2 Respuesta celular adaptativa

Otro papel fundamental frente a ECTV lo protagonizan los LTc. Los LT CD8⁺ activados secretan IFN γ , TNF α , Gz y perforina. Se ha visto que en ratones resistentes carentes de perforina, son susceptibles a la enfermedad tras ser infectados por la cepa atenuada Hampstead-egg (Mullbacher et al., 1999; Wallich et al., 2001). En animales sin Gz se observó que todos morían a los 4 dpi y que había una aceleración en la dispersión viral (Mullbacher et al., 1999). La ausencia de LTc provoca un 100% de muerte indicando la relevancia del IFN γ y la citolisis mediada por perforina. En las fases tempranas de la infección es cuando estas células tienen un papel clave, el pico de LTc se observa a 8 dpi (Karupiah et al., 1996) en los nódulos

linfáticos, sitios primarios de la infección donde evitarán la dispersión viral (Xu et al., 2007). La ausencia de la molécula co-estimuladora CD28 reveló que es clave en la resistencia a *mousepox* en B6. Estos animales presentaron una activación deficiente de LT CD8+ (y CD4+) y se observó un retraso en la respuesta celular que es fundamental para controlar la infección por ECTV. Sin embargo, la respuesta memoria de LT CD8+ no se vió afectada por esta ausencia (Fang and Sigal, 2006).

En otro estudio se puso de manifiesto el papel de los LB en la generación de Ab. Animales B6 deficientes en LB sucumben a la infección por ECTV pasada la fase efectora de los LT CD8+, es decir, mueren más tardíamente que los ratones deficientes en LT CD8+. En este trabajo además se mostró que la presencia de los Ab afecta la transmisión del virus (Chaudhri et al., 2006).

Está establecida la importancia de la activación de LT CD4+ en el marco de MHCII en la respuesta humoral y memoria. En un primer momento, se describió que los LT CD4+ son necesarios, no por su actividad citolítica, sino principalmente por la secreción de IFN γ , principalmente en la piel. En animales B6 sin LT CD4+ no hay un efecto en la mortalidad (Karupiah et al., 1996). Sin embargo, los ratones B6 tienen una respuesta polarizada hacia Th1 (IFN γ +) mientras que cepas susceptibles como BALB/c tienen una respuesta débil de Th1 o aumentada en Th2 (IL4+) (Chaudhri et al., 2004). Más recientemente, se ha descrito que los LT CD4+ con actividad citolítica (LTc CD4+) tienen una importante función frente a ECTV durante la fase aguda de la infección. Los LTc CD4+ lisan células por Fas/FasL y mediante la secreción de gránulos citotóxicos (perforina y Gz). Se ha concluido, en 2 trabajos independientes el papel fundamental en el control y supresión de la replicación de ECTV por medio de la acción citotóxica de los LT CD4+. En estos trabajos describieron un aumento en GzB, perforina y el marcador citolítico CD107a. Estos resultados fueron específicos en la infección con ECTV y no se observaron en otros poxvirus analizados (Fang et al., 2012; Siciliano et al., 2014). Por otro lado, se postula que el desarrollo de LTc CD4+ durante la infección es importante para la regulación de las CDs (Fang et al., 2012). Otro hecho distintivo de la infección con ECTV frente a la de VACV es la inflamación de la pata en el primer caso, el aumento de GzB observado tras una infección con ECTV lo relacionan con este síntoma. Otra característica específica de ECTV es que la respuesta memoria de LT CD4+, es más fuerte que frente a una infección con VACV (Siciliano et al., 2014).

El diferente perfil de citoquinas en B6 y BALB/c en los primeros h o d de la infección por ECTV está asociado a la respuesta más fuerte de células NK y LTc en la cepa resistente. Así, mientras en B6 hay expresión de IL2, IL4, IFN γ y TNF α en los primeros dpi, en BALB/c se observa expresión de IL4, poco IFN γ y ausencia de IL2 y TNF α . Sin embargo, los niveles de estas citoquinas sí adquieren un grado comparable a B6, aunque con un retraso de 1-2 d (Chaudhri et al., 2004). IL4/IL13/STAT6 está implicada en la polarización de la respuesta de los LT CD4+ hacia Th2 y desemboca finalmente en la expresión de INF γ . La IL4 tras unirse a su receptor celular activa STAT6 que señala a través de GATA3, factor de transcripción necesario en la diferenciación hacia Th2. IL13 tiene función y señalización similar a IL4. La señalización por STAT6 y la producción de IL4 contribuyen a la susceptibilidad de BALB/c por ECTV.

Modelo *mousepox*

Una primera hipótesis fue que si había deficiencias en la vía de señalización IL4/IL13/STAT6 se observaría un balance hacia Th1. Sin embargo, la falta de IL13 o STAT6 conducen a una respuesta disminuida de CD4⁺ y CD8⁺ secretoras de IFN γ y a una aceleración de la muerte en animales BALB/c. En ratones susceptibles sin IL4 no hay variación en el progreso de la enfermedad, quizá debido a la acción solapante de la IL13. La respuesta frente a *mousepox* es más compleja que el balance Th1/Th2 (Sakala et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Las vCKBPs E163 y 35-kDa de ECTV tienen distintas estrategias de actuación para inhibir la actividad de las CKs. Mientras E163 se une al dominio de unión a GAGs de las CKs, la proteína 35-kDa lo hace por el dominio de unión al receptor de estas. E163 se une a un número más reducido de CKs, mientras 35-kDa es mucho menos selectiva. Además, E163 interacciona ella misma con GAGs. Pero a pesar de conocerse en parte su funcionamiento, el mecanismo de acción de estas proteínas no está del todo comprendido.

El estudio de la interacción virus-hospedador resuelve muchas incógnitas acerca de la patogénesis viral y de la respuesta del sistema inmunitario. ECTV tiene como único hospedador al ratón y se emplea como modelo murino de la viruela. El modelo de *mousepox* es muy útil y está ampliamente extendido para investigar el papel de factores de virulencia en poxvirus. Por ello hemos elegido este modelo en nuestro estudio de las proteínas E163 y 35-kDa.

En este marco se plantearon los siguientes objetivos en la presente tesis:

1. Averiguar los mecanismos de acción de las vCKBPs E163 y 35-kDa de ECTV

- A) Caracterizar la zona de unión a GAGs de la proteína E163
- B) Completar el mecanismo de acción de E163 y 35-kDa en su interacción con CKs

2. Investigar el papel de E163 y 35-kDa en la progresión de *mousepox*

- A) Generar virus recombinantes delecionados en el gen *E163*
- B) Infectar ratones susceptibles, BALB/c y resistentes, B6, con ECTV Δ E163 y ECTV35-kDa-mut, y compararlo con el virus parental, monitorizando los síntomas de enfermedad, supervivencia y peso. Además, investigar su posible implicación en replicación, dispersión y transmisión viral
- C) Analizar la respuesta celular en la infección con ECTV Δ E163 frente a ECTV

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

La generación, amplificación y titulación de los *stocks* de baculovirus recombinantes se realizaron en células de insecto *Trichopulsia ni* (Hi5) adherentes mantenidas en cultivo en medio TC100 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS, Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma) y antibióticos, 100 µg/ml de una mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina (Sigma) y 25 µg/ml de gentamicina (Sigma). La expresión de proteína recombinante se hizo en células Hi5 en suspensión, mantenidas en medio Express Five (Gibco) con 8 mM de L-glutamina, antibióticos y aminoácidos no esenciales. Las células se cultivaron a 27°C.

Para el trabajo con ECTV, tanto en la generación de virus recombinantes, como en la titulación de los *stocks* o la obtención de SN de células infectadas con este virus, se utilizaron células BS-C-1 (células de epitelio renal de mono verde africano) que se crecieron a 37°C, 95% de humedad relativa (HR) y 5% CO₂ en medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) suplementado con 2,5 % de FCS, 2 mM de L-glutamina, antibióticos y aminoácidos no esenciales.

Para los ensayos relacionados con el análisis de las uniones a GAGs y el mecanismo de acción de las vCKBPs, se utilizaron las líneas celulares derivadas de ovario de hámster, CHO-K1, y la variante mutante, CHO-618, que tienen una mutación en la enzima galactosiltransferasa y no expresan ningún tipo de GAGs en superficie. Estas líneas se crecieron en medio DMEM:F12-HAM (Gibco), 1:1 (v/v), debidamente suplementado con 5-10% de FCS, 2 mM de L-glutamina, antibióticos y aminoácidos no esenciales, a 37°C, 95% HR y 5% CO₂.

3.2 Virus

Para la expresión de proteína recombinante, el gen correspondiente se introdujo mediante recombinación en el genoma del baculovirus de la polihedrosis múltiple nuclear de la polilla *Autographa californica*, bajo el promotor de la polihedrina.

Para los experimentos de patogénesis de *mousepox*, se utilizó ECTV-Naval.Cam que corresponde a una placa de lisis aislada del virus original, ECTV Naval, cedido por Mark Buller (University of St. Louis, USA). ECTV-Naval.Cam se aisló en nuestro laboratorio desde el bazo de un ratón infectado tras tres rondas consecutivas de plaqueo en monocapas de células BS-C-1. Se comprobó que la virulencia de ECTV-Naval.Cam en ratones BALB/c infectados tenía la misma DL₅₀ que ECTV Naval. La secuencia completa de ECTV Naval.Cam está publicada (Mavian et al., 2014).

ECTV35kDa-mut fue generado por Louis Webb en nuestro laboratorio.

3.3 CKs

Las CKs que hemos utilizado en esta tesis son de las casas comerciales Peprotech y R&D Systems. Los viales se reconstituyeron en una solución de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10mM y KH₂PO₄ 2 mM) con 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración de 10 µM, a no ser que el fabricante indicase otras condiciones. Las CKs se guardaron a -80°C en alícuotas de 1 µM de un sólo uso, especialmente para el cálculo de afinidades de unión.

| Nombre común | Nombre sistemático | Receptores |
|--|--------------------|--------------|
| MCP1 (<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>) | CCL2 | CCR2, CCR4 |
| SDF1α (<i>Stromal cell-derived factor 1-α</i>) | CXCL12α | CXCR4, CXCR7 |
| SDF1β (<i>Stromal cell-derived factor 1-β</i>) | CXCL12β | CXCR4, CXCR7 |
| BCA1 (<i>B lymphocyte chemoattractant</i>) | CXCL13 | CXCR5 |
| BRAK (<i>Breast and kidney-expressed CK</i>) | CXCL14 | Desconocido |
| SCYB16 (<i>Small inducible cytokine subfamily B member 16</i>) | CXCL16 | CXCR6 |
| SLC (<i>Secondary lymphoid-tissue CK</i>) | CCL21 | CCR7 |
| MPIF-2 (<i>Myeloid progenitor inhibitory factor 2</i>) | CCL24 | CCR3 |
| TECK (<i>Thymus-Expressed CK</i>) | CCL25 | CCR9 |
| CTACK (<i>Cutaneous T-cell-attracting CK</i>) | CCL27 | CCR10 |
| MEC (<i>Mucosa-associated epithelial CK</i>) | CCL28 | CCR10 |

Tabla 1. Listado de las CKs utilizadas en esta tesis. Indicamos nombre común, sistemático y los receptores celulares conocidos de dichas CKs.

3.4 Clonajes

El vector pALO6 (pMS30-E163Rev) contiene el gen *E163* de ECTV Naval (*EVN163*) que codifica una proteína de 223 aminoácidos. Amplificamos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la ADN polimerasa *Vent* (NEBiolabs) y con los oligonucleótidos EN163-EcoRI y EN163XhoI (Tabla 3), el gen *E163* excluyendo el péptido señal de la proteína (1-22) y añadiendo las dianas para las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Clonamos E163 (23-223) en un plásmido pFASTBAC-1 modificado, pFastBac-MELV5His, que contiene el péptido señal de la melitina en 5' y los tags V5 y 6xHis en 3' para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad. Generamos, en primer lugar, de este modo, el plásmido pHH01 (Tabla 2). Para generar los plásmidos pHH02-pHH08, que codifican las proteínas mutantes en la unión a GAGs, E163-1 a E163-7, se empleó el *kit Quick Change site-directed mutagenesis kit* (Agilent Technologies). Seguimos las instrucciones del fabricante. Brevemente, con un vector molde (Tabla 2) realizamos una PCR con oligonucleótidos complementarios que contienen las mutaciones deseadas y el vector se copia incorporando las mutaciones indicadas (Tabla 2). A continuación se digirió el ADN original (metilado) con la enzima *DpnI* y se transformaron en células competentes (*XL10-Gold ultracompetent cells*). Las colonias positivas se chequearon por digestión por endonucleasas (*EcoRI* y *XhoI*) y se secuenciaron por *Sanger* con los oligonucleótidos POL-H1 y FastBacRev (Tabla 3). En las Tablas 2 y 3 se

indican cuáles han sido los vectores molde y los oligonucleótidos utilizados para la generación de cada construcción.

Para la construcción del vector pHH12 que contiene el gen *001* de ECTV Naval (*EVN001*) que codifica la proteína 35kDa (247 aminoácidos), amplificamos el gen desde ADN viral purificado empleando los oligonucleótidos 35KEVNF4BstBI y 35KEVNR3BamHI (Tabla 3) que añaden las dianas para las enzimas de restricción *BstBI* y *BamHI*. El gen *35kDa* (1-247) lo clonamos en el vector pFastBac-MELV5His. A continuación digerimos con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, de modo que obtuvimos un fragmento que incluye nuestro gen y los tags V5 y 6xHis en C-terminal. Por último, digerimos el fragmento con las enzimas de restricción indicadas y lo subclonamos en el vector pFastBac-1, de manera que la proteína se expresó con su propio péptido señal.

| Nombre | Gen | Proteína | Vector de origen | Vector de destino | Baculovirus |
|--------|---|----------|------------------|-------------------|-------------|
| pHH01 | <i>EVN163</i> (Carla Mavian et al., 2014) | E163 | pALO6 | pFastBacMELV5His | vHH01 |
| pHH02 | <i>EVN163</i> (Carla Mavian et al., 2014) | E163-1 | pHH01 | pFastBacMELV5His | vHH02 |
| pHH03 | <i>EVN163</i> (Carla Mavian et al., 2014) | E163-2 | pHH01 | pFastBacMELV5His | vHH03 |
| pHH04 | <i>EVN163</i> (Carla Mavian et al., 2014) | E163-3 | pHH01 | pFastBacMELV5His | vHH04 |
| pHH05 | <i>EVN163</i> (Carla Mavian et al., 2014) | E163-4 | pHH02 | pFastBacMELV5His | vHH05 |
| pHH06 | <i>EVN163</i> (Carla Mavian et al., 2014) | E163-5 | pHH04 | pFastBacMELV5His | vHH06 |
| pHH07 | <i>EVN163</i> (Carla Mavian et al., 2014) | E163-6 | pHH04 | pFastBacMELV5His | vHH07 |
| pHH08 | <i>EVN163</i> (Carla Mavian et al., 2014) | E163-7 | pHH06 | pFastBacMELV5His | vHH08 |
| pHH12 | <i>EVN001</i> (Carla Mavian et al., 2014) | 35kDa | | pFastBac-1 | vHH12 |

Tabla 2. Plásmidos y baculovirus generados en el desarrollo de la presente tesis.

| Oligonucleótido | Secuencia | Vector |
|-----------------|---|----------------------|
| EN163-EcoRI | GGGGAATTCTTTATAATGGTGATACATCTATATGTAATTCTGAC | pHH01 |
| EN163-XhoI | GCGCTCGAGCCACAATTAACAAATTTTTCTTTAATATTTTACG | pHH01 |
| 1S-E163 | GAAAAACGGCAATAGATTAGCACCAGCAGACTTTGCAACTGTTCTCTCC | pHH02 |
| 1AS-E163 | GGAGGAACAGTTGCAAAGTCTGCTGGTGCTAATCTATTGCCGTTTTTC | pHH02 |
| 2S-E163 | GTGAAGTGGATGCAACAGCGGATTCATGGCAAACGGCAATAG | pHH03 |
| 2AS-E163 | CTATTGCCGTTTGCCATGAAATCCGCTGTTGCATCCACTTCAC | pHH03, pHH07 y pHH08 |
| 3S-E163 | GAATGGTCAACCAGCTGCAATATTAGCGGCAGCATTGTGAATTG | pHH04 |
| 3AS-E163 | CAATTAACAAATGCTGCCGCTAATATTGCAGCTGGTTGACCATTC | pHH04 |
| POL-H1 | GGAGATAATTAATGATAACCATCTCGC | |
| FastBac-Rev | ATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGG | |
| 35kEVNF4BstBI | GCCTTCGAATCCGACACACGCTTTGAGTTTTGTTGAATC | pHH12 |
| 35kEVNR3BamHI | GCCGGATCCATGAAACAATATATCGTCTGGCATGCATATG | pHH12 |

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en la generación y secuenciación de los plásmidos realizados en la presente tesis.

3.5 Generación de baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes se generaron utilizando el sistema de expresión Bac-to-Bac (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los genes clonados en el vector pFastBac-1 o pFastBac-MELV5His, se pueden integrar en bácmidos del genoma del baculovirus bajo la actividad del promotor de la polihedrina mediante la transformación de células DH10bac competentes tras un proceso de transposición. El DNA de los bácmidos recombinantes así obtenidos, se purificó y se transfectó con *cellfectine* (Invitrogen) en células de insecto Hi5. Los baculovirus recombinantes se recogieron a las 72 h post-transfección de los SN de las células transfectadas. Estos virus se denominaron pase 0 y se conservaron a 4°C en oscuridad. Posteriormente, estos pases 0 se titularon y se amplificaron en 2 pases consecutivos, pase 1 y pase 2, mediante la infección de células Hi5 adherentes (0,01-0,1 ufp/célula). De este modo obtuvimos un *stock* de baculovirus recombinante de alto título (superior a 5×10^7 ufp/ml) para la expresión de proteína recombinante. La titulación de las *stocks* se realizó por inmunofluorescencia. Para ello se sembraron $1,5 \times 10^6$ células Hi5 por pocillo de M6 en los que se colocaron previamente cinco cubreobjetos por pocillo. Se hicieron diluciones seriadas del *stock* con medio TC100 suplementado con 1% FCS en pocillos de M24 a un volumen final de 350 µl. Se transfirieron los cristales con las células a los pocillos con el virus y se incubó la placa a 27°C. A las 24 hpi se lavaron los cristales con PBS-completo (tampón PBS con 0,5 mM MgCl₂ y 0,9 mM CaCl₂, para evitar que las células se levanten) y se fijaron en metanol:acetona (1:1, v/v) a -20°C durante 10 min. Tras rehidratar las muestras, se bloquearon con PBS suplementado con 20% FCS y se incubaron en cámara húmeda con 50 µl del anticuerpo monoclonal anti-V5 (Invitrogen) diluido 1/400 en PBS suplementado con 5% FCS a 37°C durante 1 h. En esas mismas condiciones se incubaron los cristales con 50 µl del Ab anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen) 1/400 en PBS suplementado con 5% FCS. Finalmente, se montaron en cubres y se contaron las células fluorescentes verdes que expresan proteína recombinante mediante microscopía de fluorescencia. En el caso de no contar todas las células fluorescentes de cada preparación, se contaron las células verdes presentes en 10 campos a un aumento 40X, se calculó la media y se aplicó la siguiente fórmula:

$$[UF/ml] = (n \times 256 \times 10^x) / 0,35 \text{ ml}$$

Donde n es la media de las células contadas en los 10 campos, 256 es el número total de campos a un aumento de 40X, 10^x es el factor de dilución y 0,35 ml es el volumen final en el que se llevó a cabo la infección. El resultado se expresó en unidades UF/ml.

3.6 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Se infectaron 2×10^8 células Hi5 a alta moi (2-5 ufp/cel) con los baculovirus recombinantes correspondientes. A las 72 hpi se recogieron los SN de la infección (~ 140 ml) y se clarificaron mediante dos centrifugaciones sucesivas durante 5 min a 100 x g y 30 min a 4.000 x g. Posteriormente, se concentraron utilizando el sistema *Stirred Ultrafiltration Cell* 8200 (Amicon) hasta obtener un volumen final de 2,5 ml empleando membranas YM (Millipore) de un tamaño de diámetro de poro para un peso molecular límite (MWCO) de 10 kDa. Los sobrenadantes así concentrados se dializaron en “tampón de

unión” (50 mM fosfato sódico pH 7,4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) empleando columnas de gel filtración PD10 (Amersham Biosciences).

Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad a níquel (resina Níquel-NTA, Qiagen). Para ello, los sobrenadantes concentrados y dializados se incubaron en “tampón de unión” durante 1 h a 4°C con 0,5 ml de resina por cada 100 ml de sobrenadante inicial. A continuación, la resina se montó en columna (Poly-Prep, Bio-Rad) y se lavó con 40 ml de “tampón de lavado” (50 mM fosfato sódico pH 7,4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol) para eliminar proteínas unidas inespecíficamente. Tras ello, se procedió a eluir la proteína de interés mediante “tampón de elución” con concentraciones crecientes de imidazol (60, 100 y 250-500 mM) en 50 mM fosfato sódico (pH 7,4) y 300 mM NaCl. La proteína se recogió en fracciones de 0,6-1 ml y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie. Para el SDS-PAGE, se prepararon geles de poliacrilamida con dos zonas diferenciadas. Un primer gel concentrador al 5% de acrilamida (30% *Acrilamide/Bis Solution*, BioRad), en 1 M de Tris-HCl pH 6,8 y 0,1% SDS (Sigma) y un gel separador al 12% de acrilamida en 1,5 M de Tris-HCl pH 8,8 y 0,1% SDS. Los geles se polimerizaron añadiendo persulfato de amonio (BioRad) y reactivo TEMED (BioRad), a una relación 1/100 y 1/1000 del volumen total respectivamente. Seguidamente, las muestras proteicas se disociaron hirviendo las muestras durante 5 min en tampón de carga (0,62 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% (v/v) glicerol, 0,4% (m/v) azul de bromofenol y 5% (v/v) β -mercaptoetanol). Junto con las muestras, se analizó en los geles un pocillo con marcadores de masa molecular preteñidos (*Precision Plus Dual Color*, BioRad) o de amplio rango (BioRad) dependiendo de si el objetivo final era una inmunoelectrotransferencia (WB) o tinción de Coomassie, respectivamente. La electroforesis se desarrolló en tampón LAEMMLI 1X (25 mM Tris, 250 mM glicina y 0,001% SDS).

Posteriormente, las fracciones con mayor grado de pureza y mayor cantidad de proteína, se juntaron, se concentraron y se dializaron contra PBS utilizando micro columnas Vivaspin 500 (Sartorius) con un MWCO de 10 kDa. Finalmente, la concentración de los *stocks* de proteína obtenidos se determinó mediante densitometría respecto a curvas patrón con BSA (Sigma) y/o BCA (BCA protein assay kit, Pierce). Los *stocks* de proteína se guardaron a -20°C y a -80°C por un tiempo máximo de 6 meses habitualmente.

En nuestros experimentos se emplearon además las proteínas recombinantes B18 de VACV (Fernandez de Marco Mdel et al., 2010), M3 de MHV-68 (Parry et al., 2000), CrmC de CPXV (Smith et al., 1996), 35-kDa de CPXV-BR y 35-kDa de CPXV-Cheetah (Alcami et al., 1998) que se expresaron y purificaron por M^a Rocío Martín y M^a Carmen Fernández, de nuestro laboratorio, siguiendo el mismo protocolo descrito con anterioridad.

3.7 Cromatografía de exclusión por tamaño molecular

Se usó una columna analítica de exclusión por tamaño molecular (Superdex 200 HiLoad 16/60) acoplada a un aparato de cromatografía AKTA-FPLC (GE Healthcare) a 4°C, y detectando la absorbancia a 280 nm. La columna se calibró utilizando el conjunto de patrones de calibración de masa molecular de 12-200 kDa

(Sigma Aldrich). Los patrones utilizados y sus masas moleculares fueron: Citocromo c (12,4 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), BSA (66 kDa), Alcohol deshidrogenasa (150 kDa), β -Amilasa (200 kDa) y Azul dextrano (2000 kDa). Se inyectó una muestra de 1 ml de E163 purificada en tampón Hepes (0,15M NaCl, 0,02M Hepes y 0,001% azida sódica) a un flujo de 1 ml/min. Recogimos la muestra a partir del min 41, tras el volumen muerto.

3.8 Generación de Ab policlonales de conejo frente a E163

Inmunizamos 2 conejos hembra (cepa NZ) y realizamos 3 recuerdos cada \sim 3-4 semanas. Antes de la inmunización de los conejos y previo al 3^{er} recuerdo extrajimos \sim 1,5 ml de sangre de cada animal para analizar una posible inespecificidad en el suero pre-inmune y el reconocimiento de E163 en el suero previo al 3^{er} recuerdo. Para ello, extrajimos el suero dejando la sangre 1 h a temperatura ambiente (RT), centrifugamos a 2800 x g, 20 min a 4°C y recogimos la fase superior. Las alícuotas se congelaron a -80°C. Cada conejo fue inoculado con una mezcla que contenía \sim 250 μ g de proteína E163 recombinante en tampón PBS y 500 μ l de adyuvante completo de Freund (PIERCE). La mezcla fue sonicada (sonicador de sonda) hasta obtener una masa gelatinosa e inmiscible. Los Ab procedentes del conejo 8 (R8) son menos específicos (Fig. 6A) que los Ab procedentes del conejo 7 (R7) (Fig. 6B). Los Ab de R8 reconocen inespecíficamente, además de a la vCKBP, E163, a la proteína 35kDa. En nuestros experimentos hemos empleado los Ab procedentes de R7. Se hicieron alícuotas de 1 ml con 0,001% de azida sódica y se congelaron a -80°C.

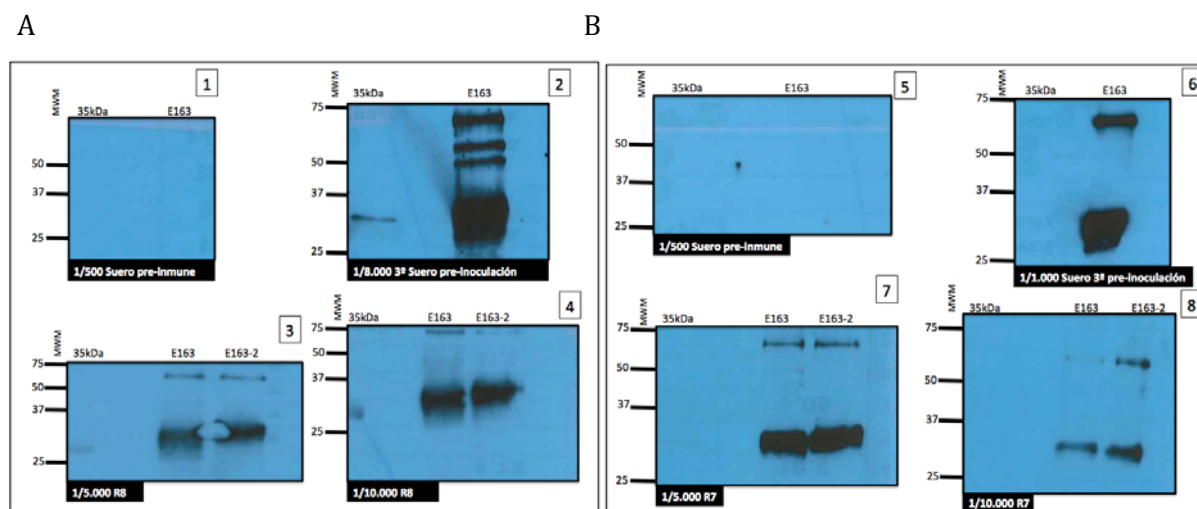


Fig. 6. Análisis de Ab policlonales frente a E163. A-B) Hemos analizado el suero pre-inmune (geles: 1 y 5), el suero previo al 3^{er} recuerdo (geles: 2 y 6) y el suero final (geles 3,4,7 y 8) de los conejos R8 (A) y R7 (B). En cada caso se muestra la dilución a la que hemos utilizado el Ab y se indica a la izquierda de cada WB, los marcadores de masa molecular (kDa). En cada carril indicamos la proteína analizada.

3.9 Preparación de SN de células infectadas con ECTV

Todos los ensayos en los que hemos empleado ECTV o las versiones mutantes de este virus se han realizado en el laboratorio de cultivos de nivel de bioseguridad 3 del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO).

Para detectar presencia o ausencia de expresión de las proteínas E163 y 35kDa en ECTVΔE163 y ECTV35kDa-mut. Infectamos con los virus mutantes y con ECTV $2,4 \times 10^4$ células BS-C-1 en pocillos de placas M6 a una moi alta (4-5 ufp/célula) en 2 ml de medio DMEM suplementado con 2,5% de FCS. La infección se recogió a las 48 hpi y los SN fueron inactivados. Para ello, los SN se incubaron durante 10 min a RT con psoraleno (Sigma) a una concentración final de 2 µg/ml disuelto en DMSO. A continuación, se irradiaron con luz UV de larga longitud de onda (365 nm) durante 10 min en un *crosslinker* (Uvitec) (Tsung et al., 1996). Tras la inactivación, los SN se concentraron 20 veces empleando tubos Vivaspin 500 (Sartorius) con un MWCO de 10 kDa. Estos SN así concentrados, se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Para los ensayos de unión a superficie celular por citometría de flujo con SN de células infectadas con ECTV y ECTVΔE163 (moi ~0,05 ufp/célula), la infección se recogió a 6 dpi. El SN de las infecciones se concentró 35 veces y a continuación se inactivaron del mismo modo indicado anteriormente.

3.10 CITOMETRÍA DE FLUJO

3.10.1 Titulación del Ab policlonal anti-E163

Para saber si el Ab policlonal anti-E163 reconocía a la proteína E163 en un ensayo por citometría de flujo y conocer a qué dilución debíamos usarlo, realizamos una titulación del mismo. Previamente a su uso en citometría de flujo, pre-adsorbimos el Ab con células CHO-K1 durante 4 h a 4°C a una relación 1:1 (v/v) (12×10^6 células/ml). A continuación, centrifugamos a $22.000 \times g$ durante 15 min, 4°C y recogimos el SN. Añadimos glicerol al 87 % (1:1) y lo congelamos a -20°C.

Para titular el Ab anti-E163, incubamos E163 purificada (250 nM) con 300.000 células CHO-K1 resuspendidas en 50 µl de PBS-*staining* (PBS suplementado con 1% FCS y 1% BSA) durante 30 min a 4°C. Realizamos las siguientes diluciones: 1/300, 1/200, 1/100 y 1/50 (Fig. 6, sólo mostramos las diluciones 1/100 y 1/50). Como Ab secundario empleamos anti-*rabbit* Alexa Fluor 488 (Invitrogen) a una dilución 1/350, 30 min en oscuridad. Pasamos 10.000 eventos en el citómetro FACSCalibur (BD) con el software Cell Quest. Los datos se analizaron con el programa informático FlowJo 8.8.6. Empleamos anti-E163 en el resto de experimentos de citometría de flujo, a una dilución 1/50.

3.10.2 Ensayos de unión a superficie celular

3.10.2.1 Proteína E163 y 35-kDa recombinantes

Analizamos la unión a superficie celular de la proteína E163, las variantes mutantes en la zona de unión a GAGs (E163-1 a E163-7), 35-kDa de ECTV y las 35-kDa de CPXV (BR y Cheetah), con ensayos por citometría de flujo empleando células CHO-K1 y la variante mutante de estas células, CHO-618, que no expresan GAGs en superficie (Zhang et al., 2006b).

Se incubaron 300.000 células con 250 nM de proteína en 50 µl de PBS-*staining* durante 30 min-1 h a 4°C. Para detectar las proteínas en la superficie, se incubó durante 30 min con una dilución 1/50 en PBS-*staining*

el Ab policlonal de conejo anti-E163 para los ensayos de E163 y E163-1 a E163-7. El Ab secundario empleado fue anti-*rabbit* Alexa Fluor 488 1/350 (Invitrogen).

Para los ensayos de unión con la vCKBP 35-kDa, utilizamos el Ab anti-PentaHis (Sigma) 1/400 y el Ab policlonal de conejo anti-35kDa (Alcami et al., 2000) a una dilución 1/75 seguido del Ab anti-*rabbit* Alexa Fluor 488 1/350 (Invitrogen).

En ambos casos recogimos 20.000 eventos por punto en el citómetro FACSCalibur (BD) con el software Cell Quest. Los datos se analizaron con el programa informático FlowJo 8.8.6.

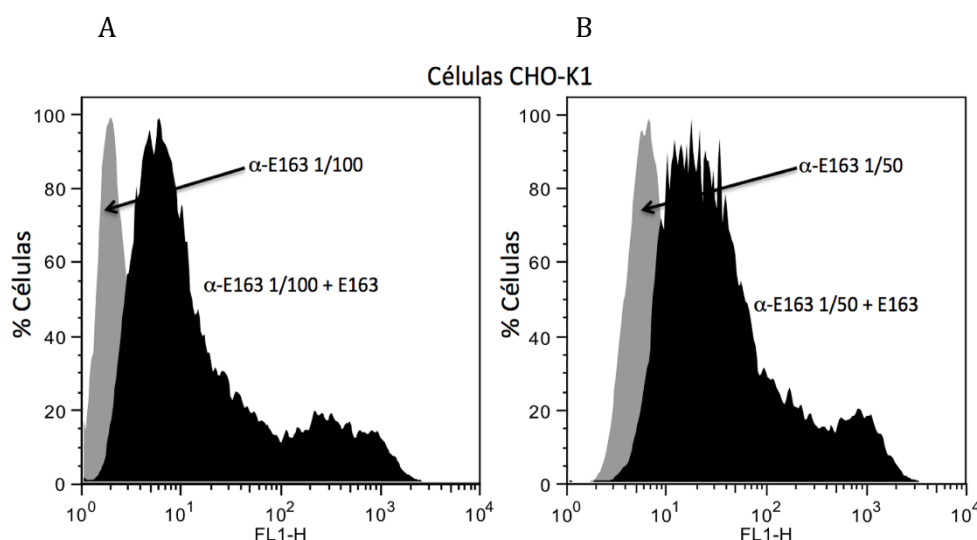


Fig. 6. Titulación del Ab anti-E163. Incubamos células CHO-K1 con la proteína E163. Colores: negro, E163 y gris, control negativo (sin proteína). Utilizamos una dilución 1/100 A) o dilución 1/50 del Ab anti-E163.

3.10.2.2 SN de infección con virus

En los ensayos de unión a superficie celular con SN de células infectadas con ECTV y ECTVΔE163, incubamos 300.000 células con 100 μl de SN concentrado de cada infección durante 30 min-1 h a 4°C. Para detectar la unión de la proteína E163 secretada al medio en la infección con ECTV, empleamos los mismos Ab que para la proteína recombinante E163. En todos los casos, se recogieron 20.000 eventos en un citómetro FACSCalibur (BD) con el software Cell Quest. Los datos se analizaron con el programa informático FlowJo 8.8.6.

3.10.2.3 Ensayos con CK biotinilada

Para probar si las vCKBPs E163 y 35kDa son capaces de inhibir la unión de CK a una superficie celular mediada por GAGs utilizamos el kit *Biotinylated Human CCL21/6Ckine* (R&D) siguiendo las instrucciones del fabricante. Utilizamos ~ 150.000 células CHO-K1 por punto. Las concentraciones usadas para E163 y las variantes mutantes en GAGs fue de 500 nM (también probamos con 1 μM, resultados no mostrados) mientras que para las proteínas 35-kDa y CrmC fue de 1 μM. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 30 min-1h a 4°C en 50 μl de PBS suplementado con 0,1 % BSA. Para el ensayo de competitividad con H (Sigma) se incubó la CK biotinilada con heparina, a una concentración final de 1 mg/ml. En todos los casos, se recogieron 20.000 eventos en un citómetro FACSCalibur (BD) y se analizaron en el programa informático FlowJo 8.8.6.

3.11 Ensayos de interacción por SPR

3.11.1 Interacción entre E163 y CKs

Para evaluar si las proteínas mutantes E163-1 a E163-7 mantenían la capacidad de unir CKs a pesar de haber perdido la unión a GAGs, realizamos ensayos de interacción a CKs murinas por SPR. En esta técnica, la proteína a analizar, o ligando, se acopla covalentemente a un *chip* de matriz de carboximetildextrano (CM4 o CM5) por aminas. Posteriormente, los analitos, potenciales ligandos de la proteína, se inyectan sobre el chip diluidos en un tampón HEPES durante un tiempo concreto. En caso de unión, la variación de masa producida en la superficie del *chip* produce un cambio en la reflexión de un láser incidente lo que se refleja en un incremento de señal (unidad de resonancia [RU]) en el sensorgrama. Tras este tiempo de asociación, el paso de un tampón de lavado sobre el *chip* produce la disociación de los analitos de baja afinidad y, consecuentemente, un descenso en la señal del sensorgrama. Para llevar la señal a los niveles basales y preparar el *chip* para la unión de un nuevo analito, se inyecta sobre el *chip* una solución de regeneración para disociar las moléculas del último analito que aún permanecían unidas al ligando. En todos los experimentos se utilizó un biosensor BIAcore X100 (GE Healthcare) disponible en el laboratorio. Para los experimentos de unión, se acoplaron covalentemente a un *chip* CM5 o CM4 (Biacore, GE Healthcare) ~ 280-850 RUs de las proteínas purificadas en una de las celdas del *chip*, la otra celda se utilizó como control de unión inespecífica. Para el cálculo de afinidades de unión, generalmente hemos empleado un *chip* CM4 y hemos acoplado entre ~ 280-350 RUs de proteína purificada. Para analizar unión de un analito con un ligando generalmente hemos empleado un *chip* CM5 acoplando ~ 650-850 RUs de proteína purificada. Las proteínas se diluyeron en acetato 10 mM pH 4,5, para acoplarla al *chip* por aminas. Las CKs recombinantes murinas y humana (hCCL21), se inyectaron a una concentración de 100 o 200 nM en tampón HBS-EP (Biacore) (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% (v/v), surfactante P20, pH 7,4), a un flujo de 10 µl/min durante 3 min. Se monitorizaron tanto la asociación como la disociación. Después de cada inyección, la superficie del *chip* se regeneró con 10 mM glicina-HCl, pH 2,0 durante 1 min.

Para la determinación de las afinidades, las proteínas recombinantes purificadas se acoplaron a baja densidad (~ 280-350 RUs) a un *chip* CM4 en una de las dos celdas del *chip*, la otra celda se utilizó como control de unión inespecífica. Se comprobó que el *chip* tuviera una capacidad de unión máxima menor o igual a 200 RUs y se inyectaron distintas concentraciones de los analitos (Locksley et al.) en tampón HBS-EP a un flujo de 30 µl/min durante 2 min y se siguió la disociación durante 5-15 min. Después de cada inyección, la superficie del *chip* se regeneró inyectando 10 mM glicina-HCl pH 2,0 durante 1 min. En todos los casos se restó la respuesta media de una inyección de tampón HBS-EP para eliminar los posibles artefactos del sistema. Los sensorgramas obtenidos se analizaron globalmente mediante el programa informático Biacore X100 Evaluation software (GE Healthcare), normalizándolos y ajustándolos al modelo de unión 1:1 de Langmuir. Se determinaron las constantes de asociación (K_a), disociación (K_d) y afinidad (K_D).

3.11.2 Interacción de proteínas con GAGs

Se generó un *chip* con H biotinilada (Calbiochem) para simular una superficie celular de GAGs. Se acoplaron ~ 2.000 RUs de estreptavidina (Sigma), diluida en acetato 10 mM pH 4,0, en un *chip* CM4 o CM5 mediante el sistema de inmovilización covalente por aminas en las dos celdas del *chip*. Se bloquearon los sitios activos de la matriz con etanolamina 1 M pH 8,5 y seguidamente, se pasaron 5 µg/ml de H biotinilada diluida en HBS-EP con 300 mM de NaCl por una de las dos celdas. La otra celda, en la que sólo se acopló estreptavidina, se utilizó como control de uniones inespecíficas. De esta manera, se consiguieron capturar ~ 10-60 RUs de H de forma prácticamente irreversible debido a la altísima afinidad de la interacción estreptavidina-biotina ($K_D \sim 10^{-14}$ M).

Para analizar la afinidad por la H, se pasaron distintas concentraciones de proteína recombinante purificada en tampón HBS-EP, regenerando posteriormente el *chip* con inyecciones de 1 min con NaCl 1M. Los sensorgramas se normalizaron y ajustaron a un modelo de Langmuir 1:1 para determinar las constantes de afinidad mediante el paquete informático BiacoreX100 Evaluation software.

Los experimentos de unión a GAGs para las proteínas recombinantes E163, E163-1 a E163-7 y 35kDa de ECTV y CPXV se realizaron con un *chip* CM5 con ~ 55 RUs de H (Sigma) o ~ 10 RUs para el caso de E163-7 y las 35-kDa. Los analitos se inyectaron a una concentración de: 150 nM para E163, y 250 nM y 500 nM para 35-kDa. Las proteínas fueron diluidas en HBS-EP, la asociación se siguió durante 3 min y la disociación durante 2 min. Tras cada analito se regeneró la superficie del *chip* con inyecciones de 1 min con NaCl 1 M.

3.12 Generación de ECTV recombinantes

Para la generación de ECTVΔE163 se ha empleado el método de selección de virus dominantes transitorios en presencia de puromicina, técnica que ha sido puesta a punto en nuestro laboratorio (Alejo et al., 2009) (Fig. 28A). Éste método permite la introducción de mutaciones, inserción o delección de genes en un virus diana sin alterar la expresión de genes colindantes ni añadir otras variaciones en el genoma viral.

ECTVΔE163 tiene delecionado el gen *E163* respecto del virus parental ECTV. En un primer paso se realiza una infección-transfección donde se infectan 24×10^4 células BS-C-1 a baja moi (0,01-0,1 ufp/célula) con ECTV y, tras 2 h de adsorción, se transfectaron con el vector pALO4 que contiene las regiones 5' (546 pb) y 3' (483 pb) flanqueantes del gen *E163*. El plásmido pALO4 contiene además el gen de la proteína verde fluorescente GFP, expresada bajo un promotor sintético tardío y el gen N-acetil transferasa de resistencia a puromicina (PAC) unida por una secuencia IRES. Tras éste paso, por recombinación homóloga, el gen *E163* será sustituido por los genes marcadores y el virus recombinante tendrá insertado en su genoma el plásmido. A continuación, se recogieron las células a 4 dpi y se someten a 3 rondas de congelación-descongelación-sonicación, para liberar el virus. Para enriquecer éste virus se realizan 3 infecciones seriadas en presencia de puromicina (Sigma) a 10 µg/ml. En cada pase se infectaron 24×10^4 células BS-

C-1 con el virus y de 6-8 hpi se añadió la puromicina. A las 48 h se recogieron las células resuspendidas en 0,5 ml de medio suplementado con 2,5 % de FCS.

Posteriormente, la muestra obtenida tras la última ronda de selección se plaqueó en ausencia de puromicina. Para ello se infectaron células BS-C-1 prefluorescentes en pocillos de placas M6, con 5-10 µl de la muestra viral y tras 2 h de adsorción se añadió medio de plaqueo, carboximetil celulosa (CMC). CMC es un medio semisólido consistente en la mezcla 1:1 de CMC (Sigma) de dos viscosidades, alta (1.500-3.000 cps) y baja (50-200 cps) a la concentración final de 0,3% en DMEM al 2,5% FBS. A los 4-5 dpi se picaron placas de lisis verdes (Fig. 28A-B) resultado de la infección por el virus recombinante transitorio que ha incorporado en su genoma el vector pALO4 completo y expresa la proteína verde fluorescente GFP (Fig. 28B). Se comprueba por PCR que dichos clones son el virus recombinante deseado empleando oligonucleótidos apropiados que diferencian el virus parental del virus delecionado (Tabla 4). Los virus delecionados se someten a rondas sucesivas de plaqueo donde el virus se resuelve perdiendo los genes marcadores (PAC y GFP) dando lugar a placas de lisis blancas que pueden ser virus recombinantes o virus parental con la misma probabilidad. Por PCR comprobamos la presencia de nuestro virus mutante (ECTVΔE163) y lo purificamos por aislamiento de placa de lisis mediante 3 rondas adicionales de plaqueo.

| Oligonucleótido | Secuencia |
|-----------------|-----------------------------|
| EN163-5 | AAGATAGAGACTCCCAAACGAG |
| EN163-6 | TCCATGGTATATGTGTTCTCATC |
| 4S-E163 | TCGTTTCGATACAAAATCTAAACAAAC |
| 4AS-E163 | AACCATCTAACAGAAATAGTGTATG |
| 5S-E163 | TAGTGTTTCGAGTGAGTTGGATTATG |
| 5AS-E163 | TCTGTATGGAATATACTCAGGAATG |

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en el análisis de ECTVΔE163. Se han empleado en el análisis por PCR durante la generación y comprobación del virus mutante.

3.13 Amplificación y semipurificación de ECTV mediante colchón de sacarosa

Este protocolo se puso a punto en nuestro laboratorio (Mavian et al., 2014). Tras obtener una placa pura de ECTVΔE163, se infectó un pocillo M6 de células BS-C-1 con 10 µl de la placa de lisis. Al observar un efecto citopático completo (4-5 dpi), se recogieron las células en 500 µl de DMEM suplementado con 2,5% FCS y se guardó a -80°C como *master stock 1* (MS1). Este *stock* se amplificó a un *master stock 2* (MS2) infectando una placa p150 con 5-10 µl del MS1. Para generar nuestro *stock* de trabajo, infectamos 4 placas p150 a baja moi (0,01-0,1 ufp/célula) y esperamos a observar efecto citopático completo (4-6 dpi). El virus se purificó en colchón de sacarosa al 36%. Se recogieron las células mediante rascado y, tras un lavado en PBS, se resuspendieron en 1 ml de Tris 10 mM pH 9,0, donde se incubaron durante 10 min en hielo. Tras ese tiempo, se dieron 25 pases en jeringuilla por aguja de 25G para romper las células y liberar el virus. Los restos celulares se precipitaron mediante centrifugación a 700 x g durante 5 min y se guardó el SN que contenía el virus, para el colchón de sacarosa. Este paso se repitió una vez más con el precipitado obtenido. Después y en tubo de ultracentrífuga, se prepararon 33 ml de sacarosa al 36% en Tris 10mM pH 9,0 filtrada por 0,22 µm. Se colocó la muestra en la parte superior del colchón cuidadosamente y se centrifugó en un

rotor AH627 de la ultracentrífuga Optima L100XP (Beckman Coulter) durante 1 h a 4°C y 20.000 rpm. Finalmente, se decantó el colchón y se resuspendió el precipitado en 500 µl de Tris 10 mM pH 9,0. La muestra purificada se guardó a -80°C.

3.14 Ensayos de formación de placa de lisis

Para determinar el título de un *stock* de virus, se infectaron monocapas semiconfluentes de células BS-C-1 ($2,4 \times 10^5$ células), sembradas en placas M6, con diluciones seriadas de los *stocks* virales en DMEM al 2,5% FBS. El rango de las diluciones seriadas generalmente ha sido entre 10^{-5} y 10^{-7} . Tras 2 h de adsorción, se añadieron 2 ml de medio de plaqueo semisólido a cada pocillo, CMC. Después de 6-7 dpi, se fijaron las células durante 30 min con formaldehído al 2% y se tiñeron con una mezcla de cristal de violeta al 2% y formaldehído al 2% durante 1h o toda la noche (o/n). Finalmente, se retiró la tinción, se aclaró con agua y se contaron las placas de lisis generadas en cada dilución para determinar el título viral en ufp/ml.

3.15 Ensayos de infección *in vitro*: ciclo único y progresión

Tanto para el ensayo de ciclo único de infección como para el ensayo de progresión de la infección, se infectaron una monocapa preconfluente de células BS-C-1 en pocillos M6 ($2,4 \times 10^5$ células). Para el ensayo de ciclo único de infección utilizamos una moi de 5 ufp/célula en DMEM al 2,5% FBS. Se determinaron los títulos virales (ufp/ml) a las 0, 3, 7, 11 y 24 hpi. Para el ensayo de progresión de la infección, la moi empleada fue 0,01 ufp/célula en DMEM al 2,5% FBS. A las 24, 48 y 72 hpi se recogieron las infecciones y se titularon. En ambos ensayos se rasparon las células, se centrifugaron a $700 \times g$, 5 min a 4°C y se resuspendieron en medio DMEM al 2,5% FCS. A continuación se congelaron y descongelaron 3 veces consecutivas en nieve carbónica y a 37°C, y se sonicaron tras cada descongelación antes de determinar la producción viral en ensayos de formación de placa de lisis.

3.16 Purificación y amplificación de ADN viral para su secuenciación por la tecnología Illumina

Para extraer el ADN viral de ECTVΔE163 y ECTV35kDa-mut, se partió de un *stock* de virus obtenido como se describe en el apartado 13. Tras la ultracentrifugación en colchón de sacarosa, el sedimento viral se incubó durante 1 h a RT con una mezcla de DNAsas (500 U/ml de DNAsa I, 500 U/ml de Nucleasa Micrococcal S7 y 20 µg/ul de RNAsa A; Roche) en un tampón 40 mM de Tris-HCl pH 8,0 10 mM de NaCl, 1 mM de CaCl₂ y 10 mM de MgCl₂ para digerir el material genético no protegido por cápsidas o envueltas. La acción de las nucleasas se detuvo mediante la adición de EGTA 2 mM y EDTA 12 mM e incubando la muestra 10 min a 75°C. Para romper las cápsidas y liberar el ADN viral, se añadieron 200 µg/ml de proteinasa K (Invitrogen) y 0,5% de SDS y se incubó 1 h a 45°C. El ADN viral se recuperó mediante una extracción clásica por fenol-cloroformo y se precipitó con 0,1 volúmenes de etanol (EtOH) absoluto, incubando a -80°C o/n. Tras centrifugar a $22.000 \times g$ a 4°C 30 min, el sedimento se lavó con

EtOH al 70% y se resuspendió en 20 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Para separar los fragmentos de tamaño pequeño correspondiente a los restos de ADN y ARN celular digerido de los genomas virales, se cargó la muestra en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (MicroSieve Clone LM agarose de Flowgen Bioscience). Se recuperó el ADN viral cortando la banda correspondiente que migraba por encima de los 4.370 pb de la banda mayor del marcador de peso molecular. El ADN extraído de banda (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen) se amplificó al azar mediante “Amplificación por desplazamiento múltiple de banda” usando los oligonucleótidos degenerados (5'-NNNNNN-3') y la ADN polimerasa del bacteriófago Phi29 (illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit; GE Healthcare, United Kingdom) siguiendo las indicaciones del proveedor pero incubando a 30°C durante 2 h y 40 min. El ADN amplificado por Phi29 se precipitó incubando 2 min con 150 µl de EtOH absoluto, se lavó con EtOH al 75% y se resuspendió en 50 µl de tampón 10mM Tris HCl pH 8,0. La presencia de ADN viral se confirmó por PCR con oligonucleótidos que amplifican genes de ECTV. También se controló por PCR la presencia de contaminaciones de genomas bacterianos con los oligonucleótidos 27f-5' y 1492R-3' que amplifican entre las posiciones 27 y 1492 del gen de ARN ribosómico 16S.

3.17 Secuenciación del genoma y ensamblaje

Para la secuenciación de ECTVΔE163 por la tecnología Illumina, 5 µg de DNA viral amplificado con Phi29 se usaron para la construcción de una librería de TruSeq. Las lecturas se obtuvieron con un analizador Ix en el Parque Científico de Madrid y para el ensamblaje de las lecturas usamos el programa CLC-Genomics Work-bench 5.5.1 (CLC bio) en su versión de prueba para mapear nuestras secuencias con el genoma de referencia ECTV-Naval bajo los siguientes parámetros: solapamiento mínimo del 90% y una identidad del 95% en dicho solapamiento.

Para secuenciar ECTV35-kDa-mut se procedió del mismo modo que para ECTVΔE163 pero para el ensamblaje y mapeo de las lecturas con el genoma de referencia (realizado en este caso por B. Hernáez de nuestro laboratorio) se usó el programa Botwie permitiendo 3 errores/lectura.

3.18 WB

Para los ensayos de WB, 10 µl de cada *stock* concentrado de los distintos SN fueron sometidos a SDS-PAGE. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia húmeda. Los sitios inespecíficos de la membrana fueron bloqueados con leche en polvo al 5% en PBS-Tween 20. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-E163 diluido 1/1.000 en tampón de bloqueo durante 1 h a RT, seguido de una incubación de 30 min a RT con un anticuerpo secundario anti-*rabbit* conjugado con peroxidasa (GE Healthcare), diluido 1/5.000 en tampón de bloqueo. Finalmente se reveló en películas Curix RP2 plus (AGFA), utilizando el procesador fotográfico X-OMAT M35 (Kodak) y un sustrato casero consistente en una dilución de 1,25 mM de luminol, 0,225 mM de ácido cumárico y 0,01% de H₂O₂ en 100 mM de Tris-HCL pH 8,5.

Para la detección de 35-kDa y CrmD se utilizaron los anticuerpos primarios, anti-35kDa (1/1.000) y anti-CrmD (1/2.500), respectivamente.

3.19 Experimentos de infección en ratones

Los experimentos de infección en ratones (modelos *mousepox*) se llevaron a cabo en un laboratorio con nivel de bioseguridad 3 (BSL3) en el animalario del CBMSO para garantizar la contención del agente patógeno. Se utilizaron ratones hembras BALB/c y C57BL/6 (Charles River y Harlan, respectivamente) con una edad de 5-6 semanas. Los animales, en grupos de cinco individuos, se alojaron en jaulas de un *rack* ventilado específico para BSL3 (Allentown, USA) con filtros HEPA. De esta forma, cada jaula tiene ventilación individualizada evitando posibles contaminaciones entre grupos. Los animales tenían acceso a agua y comida a petición, durante todo el experimento y ciclos regulares de luz-oscuridad de 12 h. Una vez establecidos los grupos de animales, estos se dejaron 5-7 d para su acondicionamiento antes de iniciar los experimentos. La ruta de infección en los animales BALB/c fue por inyección subcutánea en la almohadilla plantar de la pata posterior izquierda (FP) con 10 µl de diferentes dosis del *stock* de virus semipurificado por colchón de sacarosa y diluido en PBS con BSA al 0,1%. La ruta de infección de los ratones B6 fue intranasal (IN) haciendo respirar a cada ratón 10 µl de las diferentes dosis del virus. En cada experimento se monitorizó también un grupo de ratones control que se inocularon con 10 µl de PBS con BSA al 0,1% (ratones control o mock) para controlar las infecciones cruzadas. Todos los virus empleados en nuestros experimentos fueron titulados (ufp/ml) antes de realizar el experimento y el mismo día de la inoculación como medida control de las dosis inoculadas en cada caso.

3.19.1 Ensayos de DL₅₀

La DL₅₀ de un virus se define como la dosis necesaria para matar al 50% de los animales infectados. Grupos de cinco ratones BALB/c se anestesiaron con isofluorano y fueron inoculados con diluciones seriadas de orden 10 de los distintos virus empleados en nuestros experimentos (ECTV, ECTVΔE163 y ECTV35kDa-mut). Se siguió la evolución de la enfermedad durante al menos 21 dpi en los que tomamos diariamente datos individuales para cada ratón. Se determinó la supervivencia, peso e inflamación de la pata inoculada, y se valoraron los síntomas generales que indican la evolución de la enfermedad utilizando una escala de cuatro puntos en función del estado del pelo, postura, movilidad u otros síntomas que se pudieran apreciar. **0:** animal sano; **1:** pelo ligeramente erizado; **2:** pelo muy erizado, comienzo de conjuntivitis y/o heridas en la cola; **3:** además de lo que hay en 2, conjuntivitis evidente, caminar muy encorvado y debilidad; **4:** parálisis de cuartos traseros, movilidad casi nula, incluso pérdida de pata, conjuntivitis severa que impide abrir los ojos, gran debilidad y lesiones severas en nariz, cola y ano. Pueden tener convulsiones.

En los ratones B6 el virus se administró por la ruta intranasal (IN) tras anestesiarnos con isofluorano. Hemos seguido el mismo criterio para evaluar el grado de enfermedad pero el pelo erizado comenzaría a percibirse casi con un grado 2 de enfermedad en este caso. Algunas diferencias respecto de BALB/c son: **2**, el hocico

hinchado y deformado; **3**: hocico y cabeza deformada, convulsiones por dificultad al respirar. Los ratones B6 no pierden normalmente la pata y tienen algo más de movilidad que la otra cepa.

Para evitar el sufrimiento de los ratones, en todos nuestros experimentos de DL_{50} se estableció que un animal con una pérdida de peso igual o superior al 25% de su peso máximo debía ser sacrificado. Adicionalmente, también se sacrificaron animales con pérdida superior al 20% de su peso máximo y con puntuación mayor a 3 en enfermedad, en días consecutivos. Los procedimientos de la experimentación animal fueron aprobados por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Comisión de Seguridad Biológica del CBMSO, y se han llevado a cabo siguiendo las recomendaciones de la legislación vigente sobre experimentación con animales de laboratorio.

3.19.2 Ensayos de diseminación viral y determinación de título viral en órganos

Analizamos la diseminación viral en animales infectados con ECTV y ECTV Δ E163 a 2 y 5 dpi para ver si había diferencias en replicación y diseminación viral entre ambos virus.

Para el análisis del 2º dpi infectamos 12 animales por virus (utilizados también en un experimento de análisis celular) de las cepas BALB/c y B6. Infectamos por la ruta FP con 10^2 ufp/animal en la cepa BALB/c. Los ratones fueron sacrificados y extrajimos pata inoculada, bazo e hígado. Con la cepa B6 infectamos por la ruta i.n. con una dosis de 10^5 ufp/animal y se extrajeron bazo, hígado y pulmón. En el análisis del 5 dpi, utilizamos 5 ratones por virus. Las dosis de infección y los órganos analizados en cada cepa, fueron los mismos que para 2 dpi.

En el experimento de análisis de LTc memoria, los animales fueron sacrificados a 4 dpi. Infectamos por la ruta i.n. con 10^5 ufp/animal a todos las hembras B6: 7 previamente infectados con ECTV, 5 previamente infectados con ECTV Δ E163 y 5 infectados por primera vez con ECTV. Se extrajo el bazo, hígado y pulmón.

Los órganos diseccionados se pesaron en seco y fueron congelados a -80°C . A continuación se homogenizaron utilizando el equipo TissueLyser II (Qiagen). Para ello, se añadió a los tejidos 1 ml de PBS y una bola de acero inoxidable del diámetro de 5 mm. La vibración de la bola de acero en pulsos de 1 min a 30 Hz proporcionó la fuerza mecánica suficiente para alcanzar una homogeneización completa del tejido. En general, 1-2 veces para bazo, 2 para hígado, 3 para pulmón y 5-6 para pata (hasta que vimos el tejido homogeneizado). Para determinar la carga viral de los órganos, se infectaron monocapas preconfluentes de células BS-C-1 en pocillos M12 con distintas diluciones de los homogeneizados (diluciones seriadas entre 10^{-1} y 10^{-6}) en DMEM al 2,5% FBS teñidas y fijadas generalmente 5-6 dpi, como se describe en el punto 3.14.

3.19.3 Ensayos de transmisión viral en ratones

Para estos ensayos, grupos de ratones BALB/c se infectaron por la ruta FP con 10^3 ufp/animal con ECTV y ECTV Δ E163. A diferentes dpi, 2 ratones infectados se pusieron en contacto con 4 ratones sanos. Tras 3

días de exposición a los ratones enfermos, los ratones sanos se aislaron. Se analizaron 3 grupos de animales con distintas ventanas de exposición: 2-5 dpi (G1), 4-7 (G2) dpi y 6-9 dpi (G3). Los ratones sanos fueron monitorizados en los síntomas de enfermedad, el peso y la supervivencia durante al menos 24 días post-exposición (dpe)

3.20 ANÁLISIS CELULAR EN INFECCIONES CON RATONES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

3.20.1 Análisis de linfocitos T colaboradores, Th2, LTc, células NK y CD

Utilizamos un total 43 animales de cada cepa (BALB/c y B6) para este experimento. 12 animales por virus y 19 para los controles, animales no infectados (mock). Se hicieron 3 grupos de 4 animales por grupo. La dosis de infección fue 10^2 ufp/ratón para BALB/c (FP) y 10^5 ufp/animal para B6 (IN). Estudiamos LTc ($CD3^+ CD8^+ GzB^+$), linfocitos T $CD3^+$, linfocitos T colaboradores ($CD3^+ CD4^+$), linfocitos Th2 ($CD3^+ CD4^+ IL4^+$), células NK ($DX5^+ GzB^+$) y CD maduras ($CD11c^+ CD86^+ CD80^+$). En BALB/c infectados extirpamos únicamente el ganglio poplíteo de la pata izquierda (inoculada), mientras que en los ratones B6 extrajimos los ganglios cervicales superiores. Al extraerlos se conservaron en PBS suplementado con 1% de BSA en hielo. Los ganglios se colocaron sobre una malla de 40 μm de diámetro y se disgregaron añadiendo medio fresco. Las células se dispensaron en una placa M96 de fondo en V. Centrifugamos a $112 \times g$, 5 min a $4^\circ C$ (todos los lavados los realizamos de este modo). Primero bloqueamos los Fc de las células para evitar uniones inespecíficas añadiendo anti-CD16/CD32 (BD Biosciences) diluido 1/100 en un volumen final de 50 μl , 15 min a $4^\circ C$. En este experimento realizamos 2 tinciones distintas, en la **tinción 1** identificamos linfocitos T colaboradores, linfocitos Th2 y LTc; en la **tinción 2** identificamos células NK y CD maduras (Tabla 5). El siguiente paso fue el marcaje extracelular con los siguientes anticuerpos conjugados: anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-DX5-FITC, anti-CD11c-PE, anti-CD80-PECy7 y anti-CD86-PerCP, 30 min a $4^\circ C$ en oscuridad. A continuación, permeabilizamos y fijamos las células con el *kit* Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) con 50-100 μl /pocillo, 20 min a $4^\circ C$, en oscuridad. Por último realizamos la tinción intracelular con los siguientes Ab conjugados: anti-GzB y anti-IL4 durante 1 h a $4^\circ C$ en oscuridad. Las diluciones y la casa comercial utilizadas en cada caso están indicadas en la Tabla 5. Se pasaron $\sim 1 \times 10^6$ eventos por punto en un citómetro FACSCANTO A (Becton Dickinson) con el software FACSDiva 6.1.3. En todos los casos llevamos a cabo los controles *minus one* para los marcajes intracelulares y control isotópico para IL4. Los resultados se analizaron con el programa informático FlowJo 7.2.2.

3.20.2 Análisis de LTc y células NK

Para valorar si existía alguna diferencia en la infiltración y activación de linfocitos colaboradores, LTc y células NK en una infección con ECTV y ECTV $\Delta E163$, realizamos una primera aproximación. Infectamos por la ruta FP 6 ratones BALB/c por virus (10^2 ufp/animal) y fueron sacrificados a 2 y 6 dpi. Extirpamos ganglios linfáticos (poplíteos, inguinales y axilares) y además bazo a 6 dpi para ser analizados por citometría de flujo.

El protocolo que seguimos con los ganglios linfáticos fue el mismo indicado en el apartado 3.20.1. Juntamos cada tipo de ganglio de 3 animales para hacer un único *pool*.

| Tinción 1 | Anticuerpo | Dilución | Casa comercial |
|-----------|-----------------|----------|----------------|
| | anti-CD4-FITC | 1:100 | BD Pharmingen |
| | anti-CD8-PE | 1:75 | BD Pharmingen |
| | anti-CD3-PerCP | 1:100 | BD Biosciences |
| | anti-GzB-APC | 1:50 | BD Biosciences |
| | anti-IL4-PECy7 | 1:50 | BD Biosciences |
| Tinción 2 | anti-DX5-FITC | 1:75 | BD Pharmingen |
| | anti-CD11c-PE | 1:80 | BD Pharmingen |
| | anti-CD80-PECy7 | 1:80 | BiOLegend |
| | anti-CD86-PerCP | 1:80 | R y D Systems |
| | anti-GzB-APC | 1:50 | BD Biosciences |

Tabla 5. Ab empleados en el análisis celular. Indicamos la composición de la tinción 1 y 2, la dilución empleada y la casa comercial.

El tratamiento para el bazo fue el siguiente: Los esplenocitos se disgregan en una malla de 40 μ m de diámetro y se añadió medio fresco, RPMI suplementado con 2% de FBS. Centrifugamos la muestra a 252 x g, 5 min a RT, añadimos solución de lisis de eritrocitos antes del marcaje e incubamos 10-15 min a 4°C. Añadimos medio fresco RPMI al 10% FBS y centrifugamos 252 x g, 5 min a 4°C. Contamos las células y colocamos $\sim 3 \times 10^6$ células/pocillo de M96 de fondo en V.

A partir de éste punto, ganglios y bazo fueron tratados con el mismo procedimiento para la tinción celular indicado en el apartado 3.20.1. Los Ab extracelulares empleados fueron: anti-DX5-FITC (BD Pharmingen), anti-CD3-PerCP (BD Biosciences) y anti-CD8-APC (BD Biosciences), todos fueron utilizados a una dilución 1/200. Tras la permeabilización/fijación añadimos el Ab intracelular: anti-GzB-PE (Caltag laboratories) a una dilución 1/100. Se utilizaron los Ab isotópicos en cada caso. Analizamos ~ 250.000 células por punto en el citómetro FACSCalibur (BD) con el software Cell Quest Pro. Los datos fueron analizados con el programa FlowJo 6.4.1.

3.20.3 Análisis de la respuesta celular a largo plazo de LTc mediante activación *ex vivo*

Queríamos saber si existía alguna diferencia en la respuesta memoria de LTc al haber estado expuestos a ECTV o ECTVΔE163 y ser nuevamente infectados pasados 3 meses post-infección. Para ello, como ya detallamos en el apartado 19, re-infectamos animales supervivientes de infección con éstos virus. Sacrificamos los ratones a 4 dpi y extrajimos el bazo para este experimento. Todas las hembras B6 fueron re-infectadas con ECTV por la ruta IN (10^5 ufp/animal). Los bazos fueron tratados del siguiente modo para su marcaje para citometría de flujo, se disgregan en una malla de 40 μ m de diámetro y se añadió medio fresco, RPMI suplementado con 2% de FBS. A continuación, seguimos el mismo protocolo descrito en el apartado 20.2. Además, tras la lisis de eritrocitos y los lavados, filtramos la muestra para eliminar tejido graso, resuspendimos los esplenocitos en medio fresco y dispensamos $\sim 3 \times 10^6$ células/pocillo en una placa

M96 de fondo en V. Después, preactivamos los linfocitos exponiéndoles a 3 tipos de péptidos inmunogénicos (cedidos por el laboratorio de M. del Val): A6L, ²⁶⁵YTLIYRQL²⁷²; B2R, ⁵⁴YSQV NKRYI⁶² y B8R: ²⁰TSYKFESV²⁷ de VACV a una concentración final de 10⁻⁶ M. Incubamos los esplenocitos 1-2 h a 37°C y añadimos Brefeldina A (5 µg/ml) diluida en RPMI 10% de FBS e incubamos o/n a 37°C. Tras la activación *ex vivo* de los linfocitos procedimos a realizar el mismo protocolo para bloquear los Fc de las células inmunes, marcaje extra e intracelular indicado en el apartado 20.1. Los Ab del marcaje extracelular fueron: anti-CD3-PerCP (BD Biosciences) y anti-CD8-PE (BD Pharmingen), la dilución empleada fue 1/200 en ambos casos. El Ab de marcaje intracelular usado fue: anti-INFγ-APC (BD Pharmingen) a una dilución 1/100. Utilizamos los Ab isotópicos en todos los casos. Pasamos ~ 150.000 células por punto en el citómetro FACSCalibur (BD) con el software Cell Quest Pro. Los datos fueron analizados con el programa FlowJo 8.8.6.

3.21 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa IBM SPSS Statistics 21 (IBM Software, US). Para evaluar si las diferencias encontradas en nuestros experimentos eran estadísticamente significativas ($p < 0,05$), se aplicó un test *T de student* para muestras independientes.

3.22 Alineamiento de proteínas y representación de la estructura tridimensional

Para el alineamiento de secuencias de proteínas empleamos el software CLUSTALW seguido de ESPript 3. Con este alineamiento identificamos los residuos homólogos entre las proteínas A41 de VACV y E163 de ECTV representando la estructura tridimensional con el programa PyMOL (Delano Scientific LLC)

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 E163 *in vitro*

4.1.1 E163 de ECTV es una glicoproteína de unión a GAGs

4.1.1.1 Identificación de las zonas de unión a GAGs en E163

La proteína E163 codificada por ECTV es homóloga a la proteína A41 de VACV. En un trabajo anterior, (Ruiz-Arguello et al., 2008), señalaron en la secuencia primaria de la proteína E163 dos posibles zonas de unión a GAGs (¹⁵²LKPRDFKT¹⁵⁹ y ²¹³RKILKKKF²²⁰). Nosotros, además, hemos localizado otra posible región de unión a GAGs (¹⁴¹KTKDFMK¹⁴⁷). Para definir la implicación de estas regiones en la interacción con GAGs expresamos proteínas recombinantes mutadas en estas regiones. Hemos realizado un alineamiento de secuencias entre E163 y A41 (Fig. 8) con el fin de situar en la estructura tridimensional de A41 los residuos homólogos de E163 que hemos mutado a Ala (Fig. 9) para la identificación de las regiones de unión a GAGs en la vCKBP.

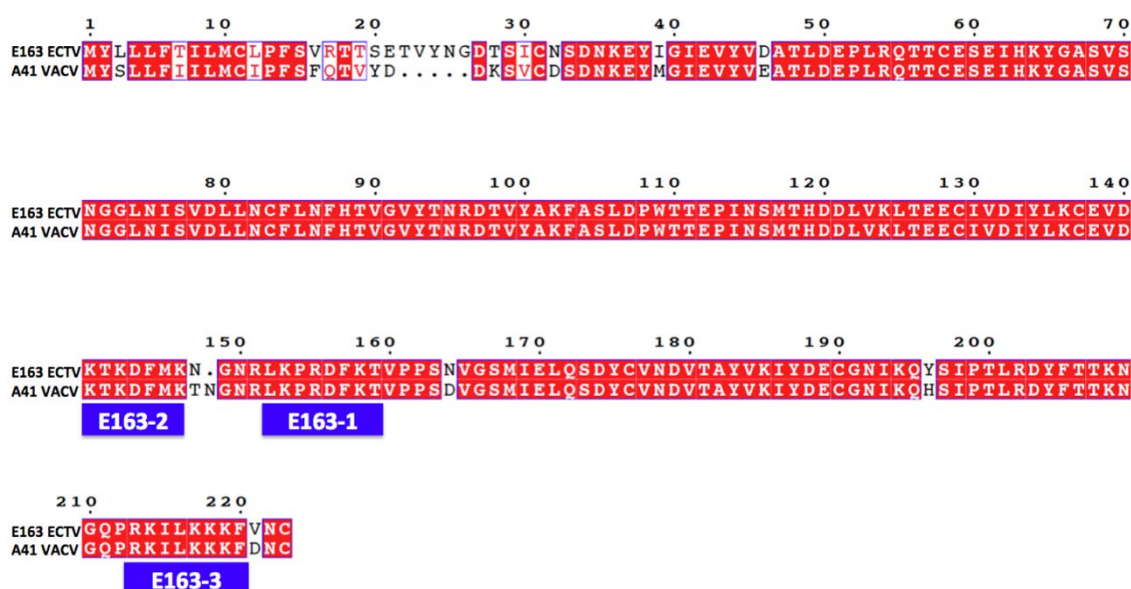
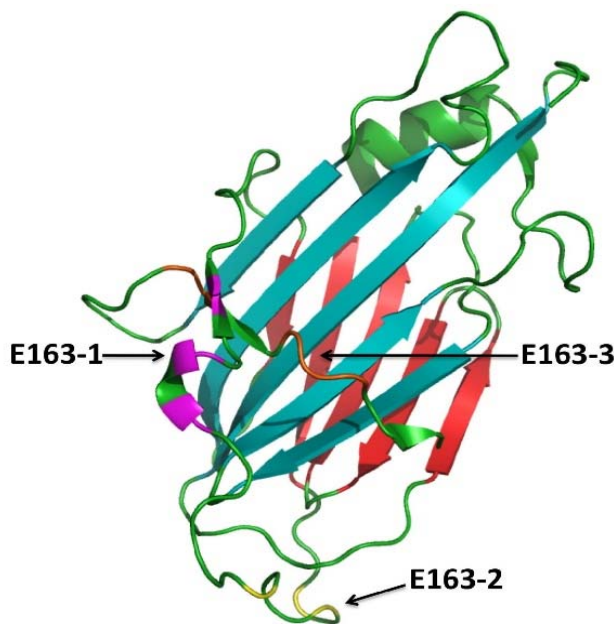


Fig. 8. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre las proteínas E163 de ECTV y A41 de VACV. Alineamiento de las secuencias de A41 VACV (Accession number (AC):P21064) y E163 ECTV Naval (AC: Q8JL79), con CLUSTALW y *ESPrpt.3*. Se indican con cajas rojas los residuos conservados y en cajas blancas los residuos similares entre ambas proteínas. Las 3 posibles zonas de unión a GAGs presentes en las proteínas mutantes E163-1, E163-2 y E163-3 se han marcado con cajas azules.

La proteína E163 tiene una estructura tridimensional en forma de β -sándwich compuesta por 2 láminas- β paralelas conectadas por largos *loops* (Fig. 9). Cada lámina- β está compuesta por 5 cadenas- β antiparalelas. Además también tiene 2 pequeñas α -hélices. Los residuos mutados en las proteínas E163-1, E163-2 (Fig. 9 y Tabla 6) forman parte del largo *loop* 9-11 (Bahar et al., 2008) que protege del solvente al núcleo de la proteína (lámina- β I). Los residuos que se han mutado en E163-3 forman parte del *loop* situado en el extremo C-terminal de la proteína. Todos éstos residuos se sitúan más cercanos a la lámina- β I en la estructura tridimensional (Fig. 9).



4.1.1.2 Clonaje de E163 y mutagénesis dirigida de las zonas de unión a GAGs

Hay descritas en la literatura secuencias consenso de unión a GAGs (Cardin and Weintraub, 1989), XBBBXXBX y XBBXBX, dónde X son aminoácidos no básicos y B residuos básicos. Hemos localizado tres posibles zonas de unión a GAGs en E163: ¹⁵²LKPRDFKT¹⁵⁹ (XBXBXXBX), ¹⁴¹KTKDFMK¹⁴⁷ (XBXBXXXB) y ²¹³RKILKKKF²²⁰ (XBXXBBBX). Para demostrar si estas regiones están implicadas en la unión a GAGs, hemos expresado 7 proteínas recombinantes mutantes (E163-1 a E163-7) (Fig. 10). Por mutagénesis dirigida hemos sustituido los residuos básicos de dichas regiones por Ala (Tabla 6). El gen *E163* (*EVNI63*) se clonó en el vector pFastBacMELV5His generando el vector pHH01 (3.4, Materiales y Métodos). Por mutagénesis dirigida sobre el plásmido de expresión pHH01, generamos los vectores pHH02 a pHH08 que fueron secuenciados por *Sanger* verificando la presencia de las mutaciones deseadas (resultados no mostrados). pHH01 a pHH08 corresponden a los vectores de expresión para el sistema de baculovirus de la proteína E163 y las versiones mutadas E163-1 a E163-7, cuyas mutaciones se especifican en la tabla 6.

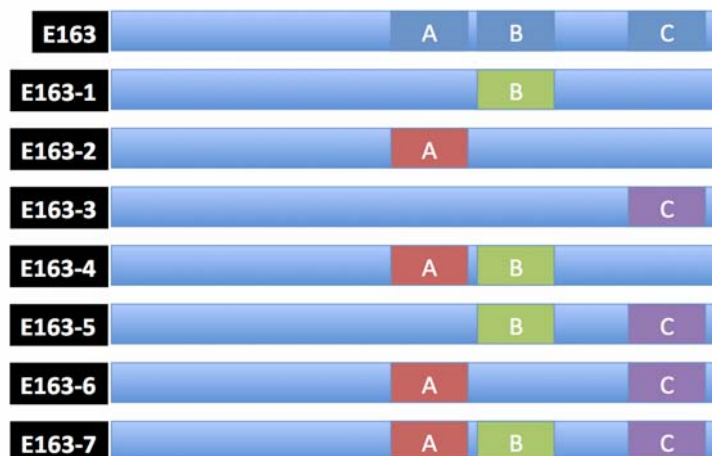


Fig. 10. Representación esquemática de las mutaciones introducidas en las proteínas E163-1 a E163-7. La zona A (rojo) corresponde a los residuos 141-147, la zona B (verde) a los residuos 152-159 y la zona C (morado) a los residuos 213-220.

| Proteína | Zona de unión a GAGs | Mutaciones |
|----------|--|---|
| E163-1 | ¹⁵² LKPRDFKT ¹⁵⁹ (B) | K153A R155A K158A |
| E163-2 | ¹⁴¹ KTKDFMK ¹⁴⁷ (A) | K141A K143A K147A |
| E163-3 | ²¹³ RKILKKKF ²²⁰ (C) | R213A K214A K217A K218A K219A |
| E163-4 | A + B | |
| E163-5 | B + C | |
| E163-6 | A + C | |
| E163-7 | A + B + C | |

Tabla 6. Descripción de las zonas de unión a GAGs y mutaciones introducidas en las proteínas E163-1 a E163-7.

4.1.1.3 Generación de baculovirus recombinantes que expresan las proteínas E163 y las versiones mutadas

Con los plásmidos de expresión pHH01 a pHH08 generamos los baculovirus recombinantes vHH01 a vHH08 para la expresión de las proteínas E163 y E163-1 a E163-7. Se transfectaron células de insecto Hi5 y se recogieron los baculovirus recombinantes en un pase 0. Realizamos infecciones seriadas hasta el pase 2 para aumentar el título viral hasta 1×10^8 ufp/ml, típicamente. La expresión de las proteínas recombinantes que se detectó por WB desde el pase 0 (Fig. 11A). También infectamos una monocapa celular de Hi5 a distintas moi (1, 5 y 10 ufp/célula) y recogimos a diferentes hpi (24, 48 y 72) (Fig. 11B) con la finalidad de identificar las condiciones óptimas de expresión, que fueron con una moi 5-10 ufp/célula y recogiendo los SN a 72 hpi. Aunque todas las proteínas recombinantes fueron tratadas del mismo modo, aquí sólo mostramos algún ejemplo (Fig. 11).

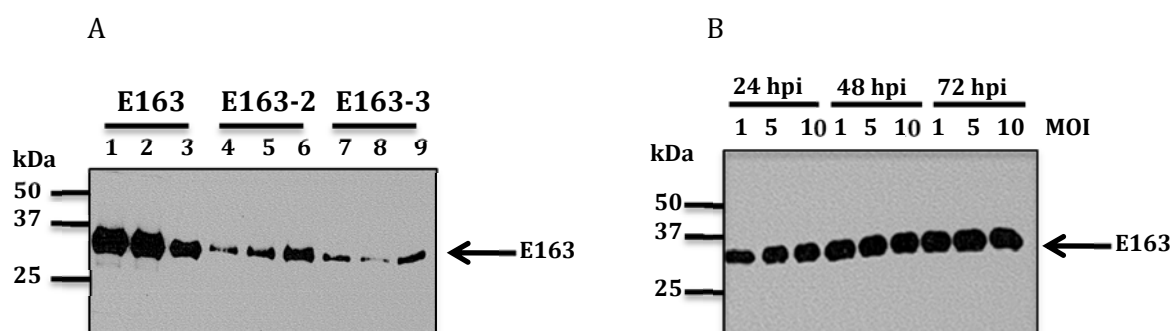


Fig. 11. Expresión de las proteínas E163, E163-2 y E163-3 en el sistema de baculovirus. A) WB de SN de las infecciones de los baculovirus vHH01, vHH03 y vHH04 recogidos a 72 hpi. El Ab empleado fue anti-V5 que reconoce específicamente las proteínas recombinantes. Se analizaron 3 clones en paralelo en cada caso. Carriles 1, 2 y 3, pase 2 de vHH01 (E163); carriles 4, 5 y 6, pase 0 de vHH03 (E163-2); y carriles 7, 8 y 9, pase 0 de vHH04 (E163-3). B) Expresión de la proteína recombinante E163 en el SN de cultivos infectados con el baculovirus vHH01 (E163) a diferentes moi y recogidos a las hpi indicadas. A la izquierda se indican los marcadores de masa molecular (kDa). La flecha de la derecha corresponde a la posición de las proteínas E163 recombinantes. Se empleó el Ab anti-V5.

4.1.1.4 Purificación y cuantificación de las proteínas E163 y E163-1 a E163-7

Con objetivo de producir altas cantidades de proteína recombinante, se infectaron 2×10^8 células Hi5 en suspensión a alta moi (5-10 ufp/célula) con el pase 2 del baculovirus recombinante. El SN se recogió a 72 hpi y se sometió a 2 centrifugaciones consecutivas para eliminar restos celulares o agregados. A continuación se concentraron, dializaron y purificaron por cromatografía de afinidad a níquel (3.6, Materiales y Métodos). Las proteínas se eluyeron en concentraciones crecientes de imidazol (40, 60, 100 y 250-500 mM). Se muestra como ejemplo la purificación de la proteína E163. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 12A). Aquellas que contenían mayor cantidad de proteína y un mayor grado de pureza se juntaron y se dializaron contra PBS hasta un volumen final de 100-200 μ l (fracciones 6-12) (Fig. 12A). Las proteínas con un grado de pureza de al menos un 90% se cuantifican por densitometría con respecto a un patrón conocido de BSA, se muestra como ejemplo la cuantificación de la proteína E163-1 (Fig. 12B). Las alícuotas se congelan a -20°C para su posterior uso en los experimentos. Las concentraciones varían desde 1-8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, según la proteína recombinante.

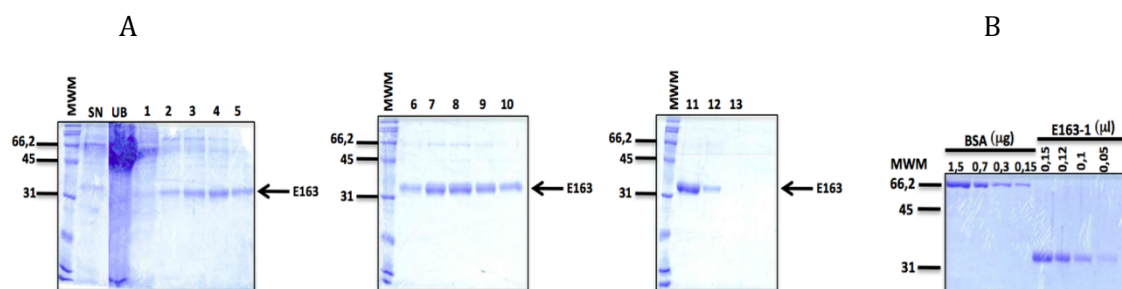


Fig. 12. Purificación y cuantificación de las proteínas E163 y E163-1. A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie donde se han cargado las distintas fracciones de la purificación de la proteína E163 por cromatografía de afinidad con Ni-NTA. SN: sobrenadante de la infección; UB: proteína no unida a la resina de níquel tras el tampón de lavado; carriles 1-13 corresponden a las fracciones eluidas con tampón de elución en concentraciones crecientes de imidazol: 40 mM (1), 60 mM (2-5), 100 mM (6-9) y 500 mM (10-13). B) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de la cuantificación de la proteína E163-1. En el gel se muestra una curva patrón con cantidades crecientes de BSA a la izquierda y a la derecha se indica el volumen de la proteína problema. La muestra tiene una concentración de 4,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.1.1.5 Ensayos de interacción a GAGs por SPR

Con objeto de estudiar la interacción de las proteínas recombinantes con GAGs mediante la técnica de SPR, acoplamos a un *chip* CM5 H biotinilada creando una superficie sintética de GAGs. Realizamos ensayos de interacción con los analitos E163 y E163-1 a E163-7 en un biosensor BIAcore X100. Mientras que pudimos detectar la interacción de la proteína E163 con la superficie de H, encontramos que las proteínas E163-1 a E163-7 perdían total o parcialmente su capacidad de unión a H (Fig. 13A y B). Cuando mutamos una región, E163-1(B), E163-2 (A) o E163-3 (C) (Fig. 13A) vemos que se pierde totalmente la unión a GAGs, en E163-1 y E163-3; casi totalmente, en el caso de E163-2. Cuando mutamos 2 regiones a la vez, E163-4 (A+B), E163-5 (B+C) y E163-6 (A+C), vemos que aunque han perdido casi la totalidad de la capacidad de unión, sobre todo en E163-4 y E163-5, lo que se altera además es la disociación del complejo, sobre todo en E163-6. Cuando mutamos las 3 zonas en una misma proteína, E163-7, observamos que es la proteína mutante que más se une a heparina y además también forma un complejo más estable, quizá explicado por

la pérdida de la configuración espacial de la proteína y que pudieran quedar ciertos residuos básicos al descubierto con las mutaciones aplicadas (Fig. 13B). Los residuos mutados en las proteínas E163-1 (región B), E163-2 (región A) y E163-3 (región C) son responsables de la unión a GAGs en la proteína E163, ya que al mutar los residuos básicos de dichas zonas, la proteína E163, pierde su capacidad de unión a H en una superficie sintética que simula los GAGs presentes en una célula.

La afinidad de E163 a H es alta ($K_D=19,1$ nM) (Ruiz-Arguello et al., 2008). Generamos una superficie sintética de GAGs con H biotinilada en un *chip* CM4 acoplado 10 RUs, para calcular la afinidad de E163-2 pero no hemos obtenido suficiente curvatura en los sensorgramas de nuestros experimentos para poder ajustarlo al modelo de unión 1:1 de Langmuir (resultados no mostrados).

4.1.1.6 Ensayos de unión a superficie celular de la proteína E163

4.1.1.6.1 La proteína E163 producida en infecciones con ECTV interacciona con la superficie celular

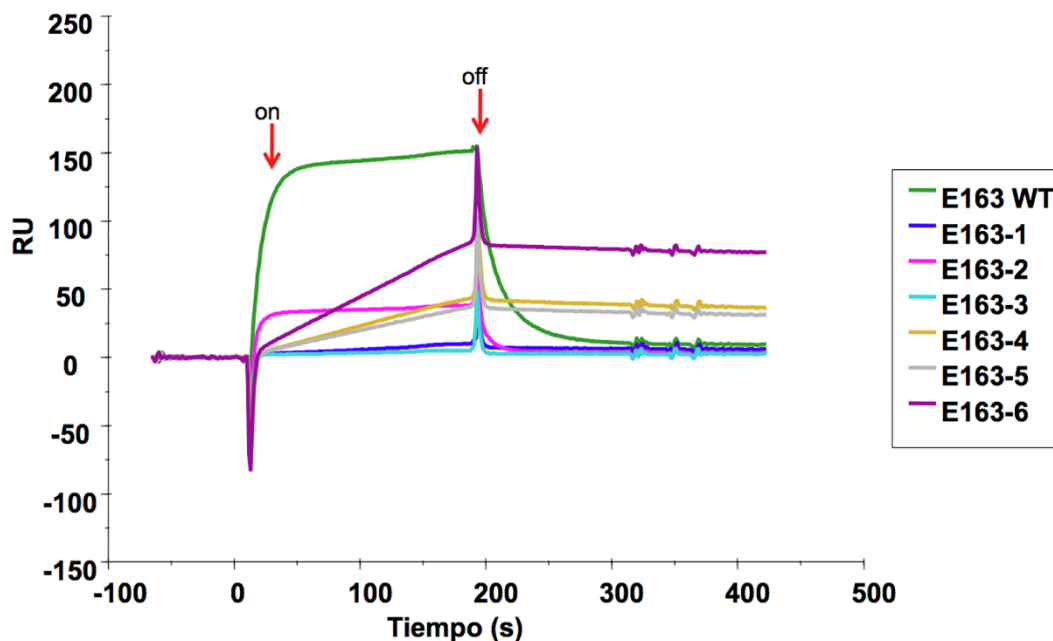
Con la finalidad de demostrar si la proteína E163 producida en infecciones con ECTV interacciona con la superficie celular a través de GAGs, el SN concentrado de cultivos de células BS-C-1 infectadas con ECTV se utilizó en experimentos de unión a células CHO-K1 por citometría de flujo. SN procedente de infecciones con el virus mutante (ECTV Δ E163) se utilizó como control negativo. Este experimento nos permitió verificar que la proteína E163 presente en la infección con ECTV es capaz de unirse a la superficie celular (Fig. 14B), mientras que con SN de células infectadas con ECTV Δ E163 no observamos dicha unión a la superficie celular (Fig. 14D). Las diferencias entre el control negativo (sin SN) y el SN de la infección con ECTV Δ E163 no fueron significativas (Fig. 14D y E), sin embargo, la diferencia entre el SN procedente de la infección con ECTV y la infección con el virus mutante sí fue significativa (Fig. 14C y E).

4.1.1.6.2 Ensayo de unión de E163, E163-1 a E163-7 a células CHO-K1

Con objeto de conocer si las zonas de unión a GAGs identificadas *in vitro* por SPR también son responsables de la interacción con la superficie celular en donde hay un conjunto más complejo de GAGs, realizamos ensayos de unión por citometría de flujo con las proteínas recombinantes. Para ello, empleamos en nuestros experimentos células CHO-K1 que sintetizan todos los tipos de GAGs. La incubación de las proteínas E163 y E163-1 a E163-7 con células mostró que las regiones A, B y C de E163 están implicadas en la unión a GAGs (Fig. 15A y B). La mutación de los residuos básicos de la región B es imprescindible para la pérdida de unión a GAGs pero debe de ir acompañada por las mutaciones presentes en la región A ó C, simultáneamente, para perder la unión a la superficie celular mediada por GAGs, es decir las regiones A+B (E163-4) ó B+C (E163-5). Las proteínas E163-4 (A+B) y E163-5 (B+C) han perdido la capacidad de unión a la superficie celular mediada por GAGs (Fig. 15A y B). El experimento se ha realizado al menos en 3 ocasiones bajo los mismos parámetros y aunque hemos tenido cierta variabilidad en los resultados, en

todos los casos, las proteínas E163-4 y E163-5 han perdido significativamente la capacidad de unión a GAGs.

A



B

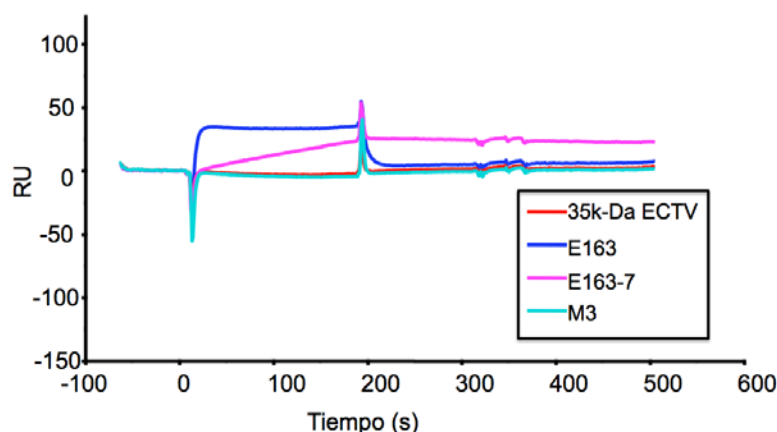


Fig. 13. Ensayo de unión a heparina de E163 y E163-1 a E163-7 por SPR. Sensorgrama de los experimentos. A) Se indica con flechas, el inicio (on) y fin (off) de la inyección. Acoplamos 55 RU de heparina biotinilada sobre un *chip* CM5. Las proteínas purificadas (E163, y E163-1 a E163-6) se han inyectado a una concentración final de 150 nM. B) Acoplamos a un *chip* CM4 ~10 RU de H biotinilada. Las proteínas purificadas se han inyectado a una concentración final de 150 nM (E163 y E163-7). A y B) El tiempo de asociación fue de 3 min, a una velocidad de flujo de 10 μ l/min. Seguimos la disociación durante 2 min.

4.1.1.6.3 Ensayo de unión de las proteínas E163 y E163-1 a E163-7 a células CHO-618

Las células CHO-618 son deficientes en la síntesis de GAGs con lo que son un buen control para probar la especificidad de las regiones de unión a GAGs (A, B y C) identificadas en la proteína E163. Observamos que existe una unión inespecífica a la superficie celular de las células CHO-618 en parte debido al Ab primario policlonal (Fig. 16B). No pudimos detectar diferencias en la unión a la superficie celular entre las proteínas mutantes (E163-1 a E163-7) y la proteína E163, lo que confirmó que la pérdida de unión en las proteínas E163-4 y E163-5 a la superficie de las células CHO-K1 es debida a la presencia de GAGs (Fig. 16). Podemos afirmar que las regiones A, B y C de E163 son zonas de unión a GAGs en esta proteína.

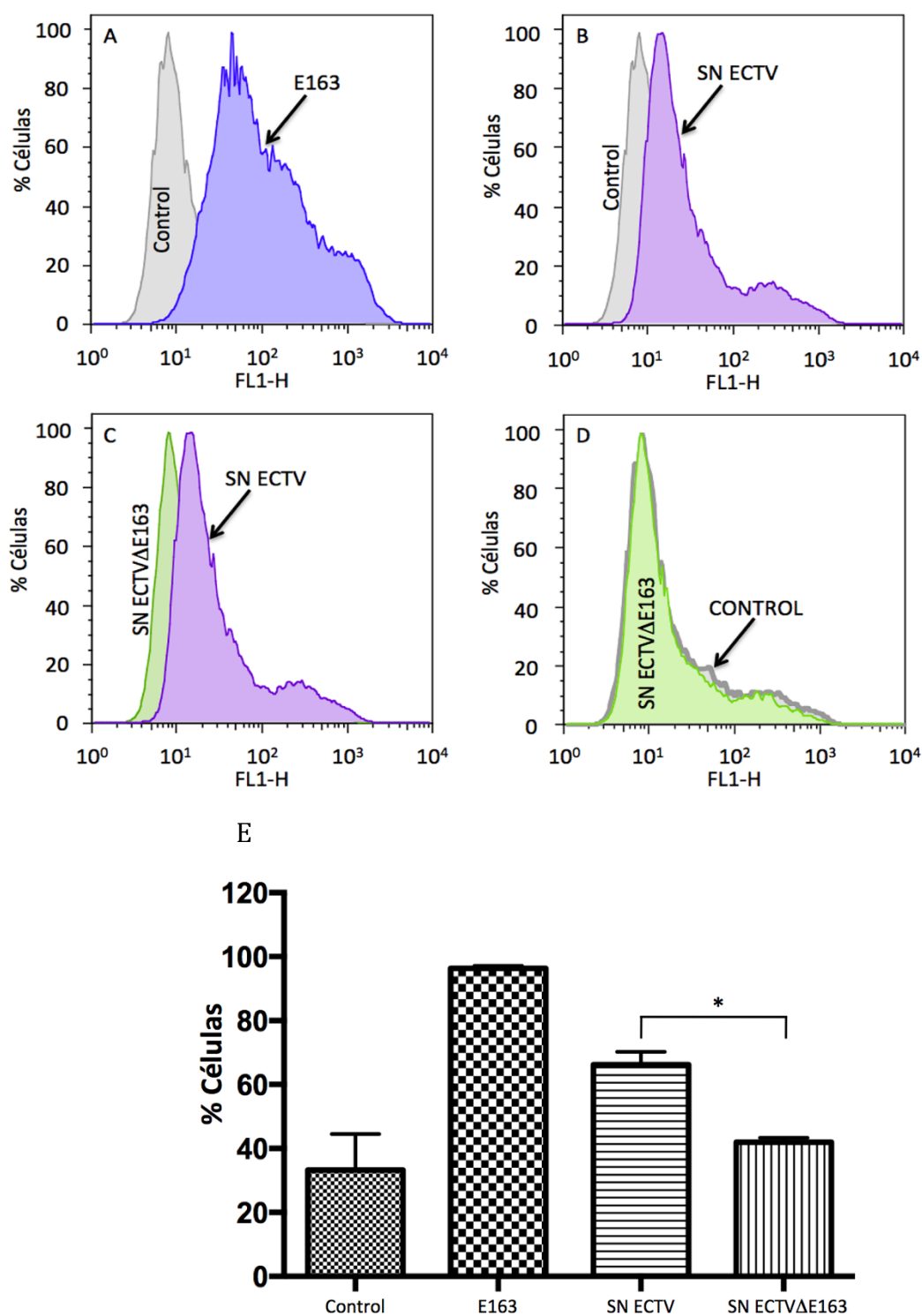


Fig. 14. Ensayo de unión a células de SN de infecciones con ECTV y ECTVΔE163. Los SN concentrados de las infecciones se incubaron con células CHO-K1. Utilizamos en la detección un Ab primario policlonal anti-E163 y un Ab secundario anti-rabbit-Alexa Fluor 488. A-D) Histogramas del ensayo por citometría de flujo. E) Se representan las medias de cada muestra (n=4) y sus desviaciones estándar. La diferencia significativa ($p < 0,05$) se indica con un asterisco (*).

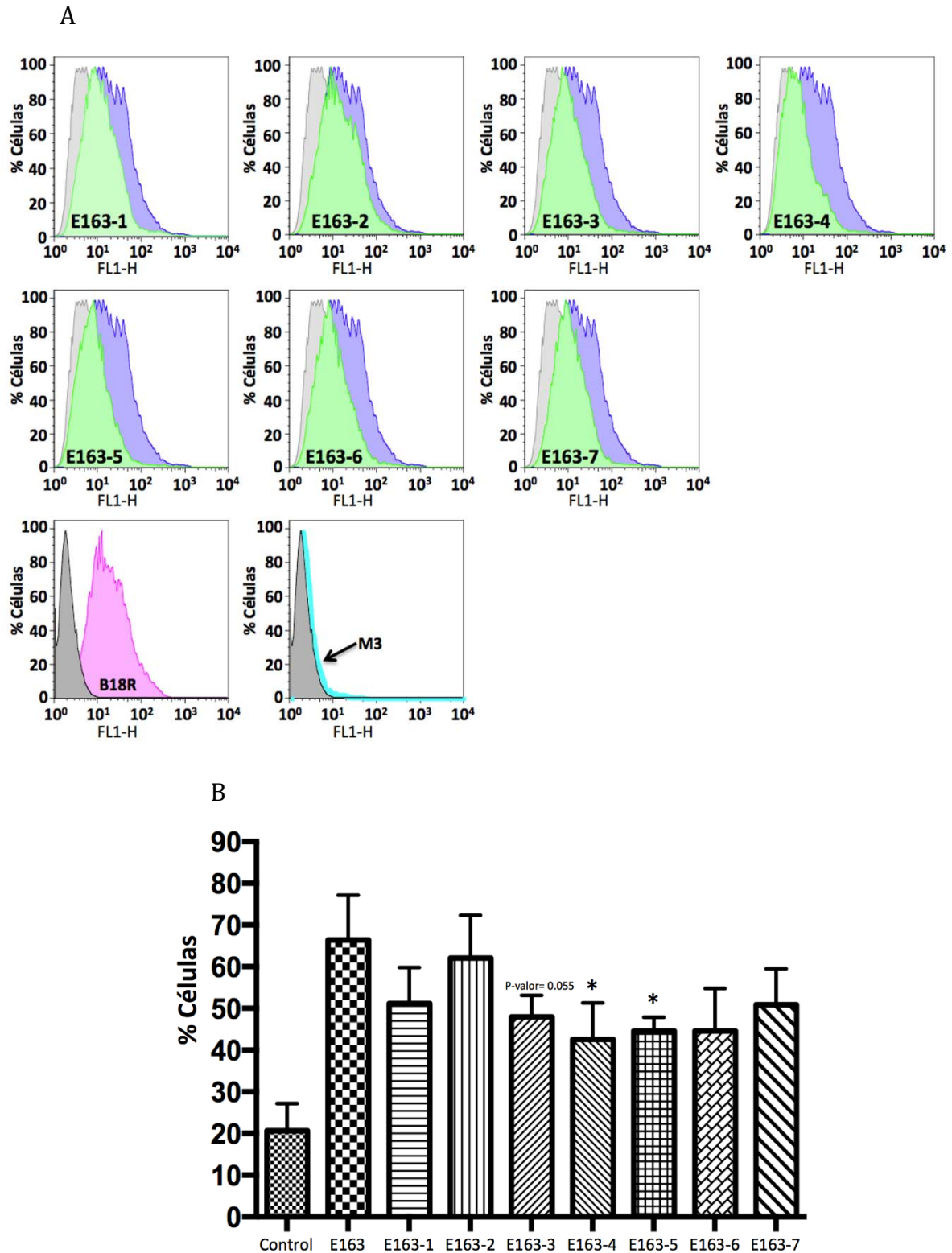


Fig. 15. Ensayo de unión a la superficie celular por citometría de flujo de las proteínas E163 y E163-1 a E163-7. A) Histogramas procedentes del experimento de unión a células. Los colores corresponden con: Gris, control negativo (sin proteína recombinante); azul, E163; verde, las proteínas mutantes (E163-1 a E163-7), rosa, control positivo (B18 de VACV) y azul cian, control negativo (M3 de MHV-68). **B)** Se representa la media del porcentaje de células positivas en cada caso ($n=3$) y sus desviaciones estándar. Los asteriscos (*) indican que hay una diferencia significativa ($p<0,05$) respecto de E163. Se empleó anti-E163 para la detección de las proteínas.

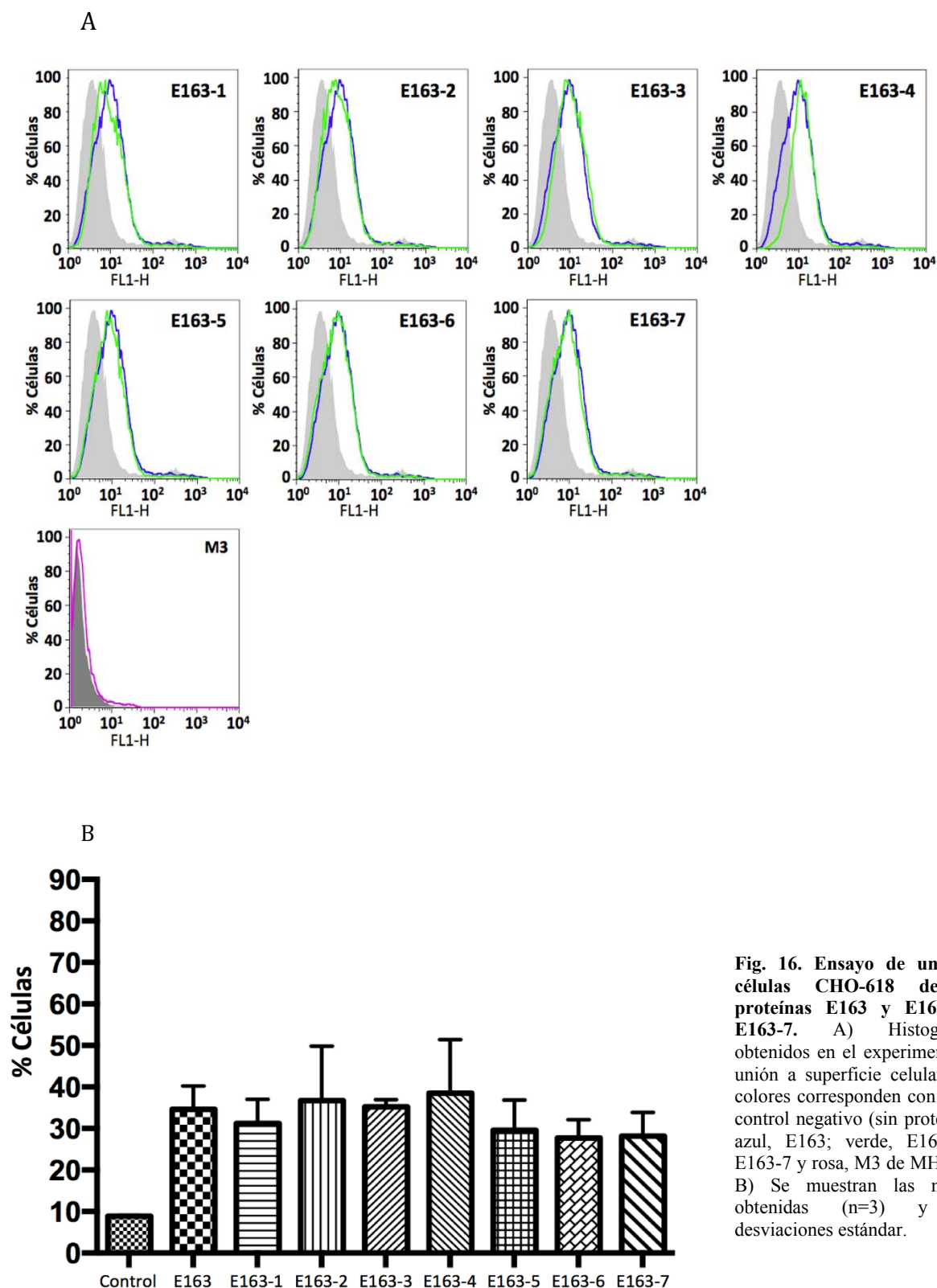


Fig. 16. Ensayo de unión a células CHO-618 de las proteínas E163 y E163-1 a E163-7. A) Histogramas obtenidos en el experimento de unión a superficie celular. Los colores corresponden con: Gris, control negativo (sin proteína) ; azul, E163; verde, E163-1 a E163-7 y rosa, M3 de MHV-68. B) Se muestran las medias obtenidas (n=3) y sus desviaciones estándar.

4.1.2 La proteína E163 es una vCKBP

4.1.2.1 Ensayo de unión de E163 y E163-1 a E163-5 a CKs por SPR

En un trabajo anterior se demostró que E163 se unía a un conjunto de CKs humanas y murinas (Ruiz-Arguello et al., 2008). Las CKs murinas que formaban un complejo de alta afinidad fueron: CCL21, CCL24,

CCL25, CCL27, CCL28, CXCL12 α , CXCL12 β , CXCL13 y CXCL14. Las mutaciones realizadas en E163 se sitúan en el *loop* 9-11 y en el *loop* C-terminal de la proteína, que se sitúa más cercana a la lámina- β I en la estructura tridimensional (Fig. 9). Nosotros quisimos saber una vez caracterizada la zona de unión a GAGs en E163, si la pérdida de unión a GAGs podría afectar también a su unión a CKs o si por el contrario estas zonas son independientes, ya que según otras publicaciones responsabilizan a la lámina- β II de la región de unión a CKs (Bahar et al., 2008). Para ello acoplamos a un *chip* CM5 o CM4 las proteínas E163 y E163-1 a E163-5 (200-800 RUs). Hemos usado como analitos las CKs murinas: CCL2, CCL21, CCL24, CCL27, CXCL12 α , CXCL12 β , CXCL13, CXCL14 y CXCL16 (100-200 nM). Las CKs CCL2 y CXCL16 han sido utilizadas en nuestros experimentos como control negativo por lo que vemos que no se unen a nuestro ligando en ninguno de los casos (Fig. 17). Lo que detectamos es que todas las proteínas mutadas siguen uniendo CKs aunque es posible que se haya modificado en cierto grado la capacidad de unión a CKs, sobre todo en el caso de E163-5. Por lo tanto, no podemos afirmar que las zonas de unión a GAGs y CKs en la proteína E163 sean del todo independientes. E163-1 sí une CXCL14 en otros ensayos (resultados no mostrados).

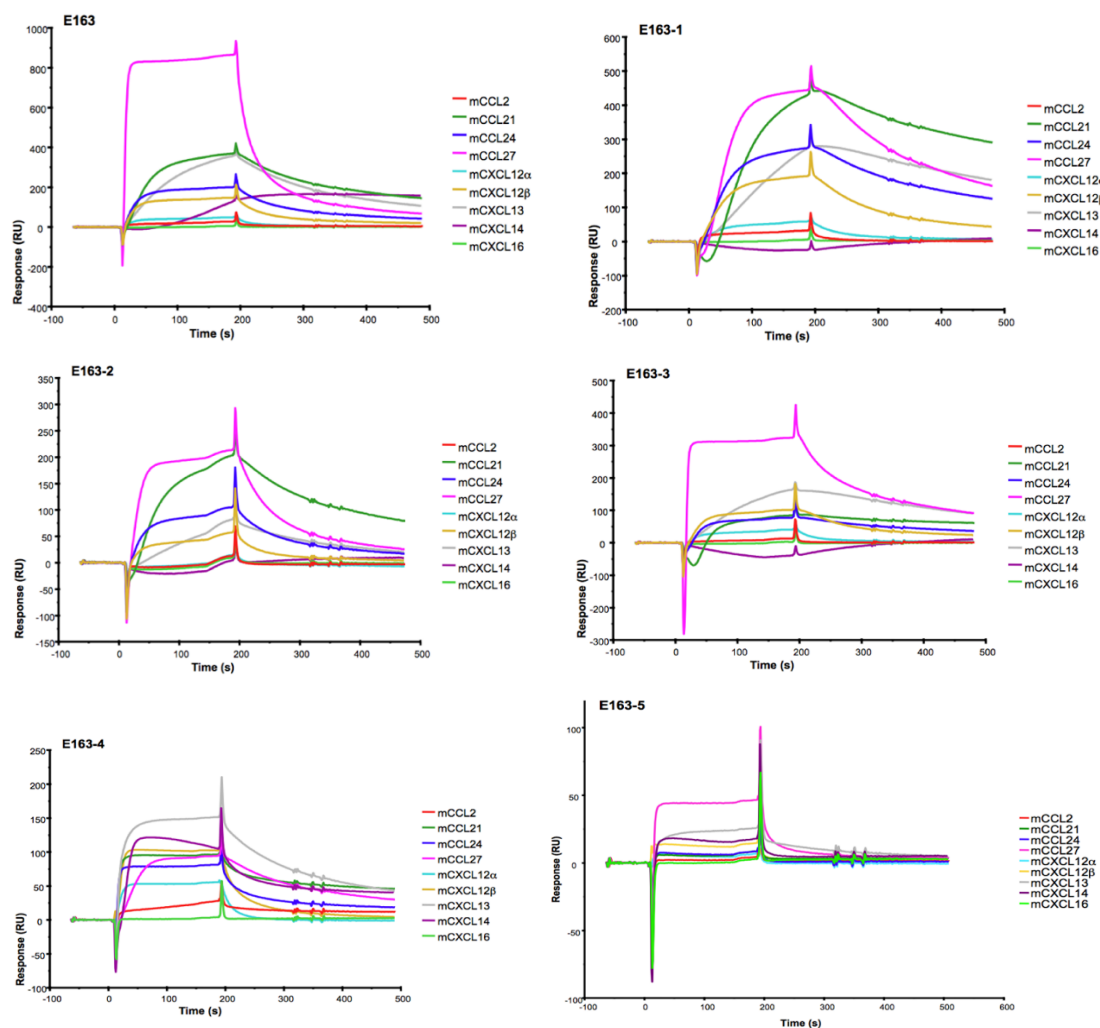


Fig. 17. Análisis de unión a CKs de las proteínas E163 y E163-1 a E163-5 por SPR. Las proteínas E163 y E163-1 a E163-5 (200-800 RUs) se acoplaron a un *chip* CM5 o CM4. Los analitos se inyectaron durante 3 min a 10 μ l/min a una concentración final de 100-200 nM y se siguió la disociación durante 2 min. Se muestran los sensorgramas en cada caso.

4.1.2.2 Determinación de las afinidades de unión de E163 y E163 mutantes a CKs mediante SPR

Hemos calculado afinidades de unión de las diferentes proteínas mutantes de E163 a algunas CKs para saber si realmente han perdido o no afinidad a CKs respecto de la proteína parental. Para ello acoplamos a un *chip* CM4 (150-300 RUs) E163, E163-1, E163-2, E163-4 y E163-5 y pasamos a gran velocidad (30 μ l/min) las diferentes CKs con un tiempo de asociación de 2 min y un tiempo de disociación de 5-15 min. Comparando la afinidad (K_D) de E163 por CXCL12 β (= 2 nM) y las proteínas mutantes E163-1 a E163-5, se puede observar que, con la excepción de E163-2, el resto de los mutantes habían perdido algo de afinidad por esta CK (Tabla 7). Los resultados muestran que E163-1 ha perdido cierta afinidad (K_D) por CXCL13 y CXCL14. En el caso de E163-2 lo que observamos es que había perdido cierta afinidad por CCL21 y CCL24 pero que mantiene la afinidad por CXCL14 y CXCL12 β , parece que mantiene la misma afinidad por CKs CXC y pierde algo de afinidad en las CKs CC. Sin embargo, E163-5 parece tener una afinidad similar por hCCL21 (K_D =4,59 nM) comparada con los datos previamente publicados para E163 (K_D =12,7 nM) (Ruiz-Arguello et al., 2008).

La región B (E163-1, E163-4, E163-5) y C (E163-5) podrían afectar más a la unión a CKs mientras que la región A (E163-2) sería más independiente de la zona de unión a CKs.

4.1.2.3 Capacidad de la proteína E163 de interferir la unión de CKs a la superficie celular

La mayoría de las CKs se unen a la superficie celular por medio de GAGs generando un gradiente quimiotáctico que alerta a los leucocitos circulantes del foco de la infección (Proudfoot, 2006). Para averiguar si la proteína E163 es capaz de inhibir la interacción de las CKs a una superficie celular mediada por GAGs, evitando la formación de dicho gradiente, realizamos un experimento que simula la circunstancia *in vivo* del posible mecanismo de acción de esta vCKBP. Así, hemos empleado en este experimento, la CK CCL21 humana (hCCL21) que es también ligando de la proteína E163 (Ruiz-Arguello et al., 2008). Hemos incubado hCCL21 en células CHO-K1 y hemos observado unión (Fig. 18A). En células CHO-618, condiciones en las que no hay unión a la superficie celular por la ausencia de GAGs, no hay unión (Fig. 18B). Realizando un ensayo de competición en presencia de H también comprobamos que la unión de hCCL21 a la superficie celular en células CHO-K1 es específica de GAGs (Fig. 18C). Cuando incubamos hCCL21 con la proteína CrmC (control negativo) no encontramos ningún efecto (Fig. 18D). La presencia de la proteína E163 o E163-4, incubadas con la CK, tampoco tuvo ningún efecto sobre la unión de hCCL21 a GAGs (Fig. 18E), sin embargo, cuando incubamos la proteína E163-5, que no se une a GAGs, observamos una disminución significativa de la interacción de CCL21 y la superficie celular (Fig. 18F y G). La pérdida de unión a GAGs es más significativa en E163-5 ($p=0,028$) comparada con E163-4 ($p=0,041$). La inhibición de la interacción entre CCL21 y la superficie celular inducida por E163 no podemos observarla en este experimento ya que la vCKBP se queda también retenida en la superficie celular. Sin embargo, la proteína mutante E163-5 que no se une a GAGs, nos permite ahondar en el mecanismo de acción de la proteína parental.

| CK | Proteína | ka (1/Ms) | kd (1/s) | K _D (nM) |
|----------|----------|-----------|-----------|---------------------|
| mCXCL12β | E163 | 1,96E+06 | 4,100E-03 | 2,00 |
| | E163-1 | 3,22E+06 | 9,548E-02 | 29,65 |
| | E163-2 | 4,47E+05 | 9,000E-04 | 2,00 |
| | E163-4 | 9,37E+05 | 2,546E-02 | 27,17 |
| | E163-5 | 2,41E+06 | 9,652E-02 | 40,03 |
| mCXCL13 | E163 | 1,20E+06 | 1,059E-03 | 0,83 |
| | E163-1 | 1,24E+05 | 5,304E-03 | 42,76 |
| mCXCL14 | E163 | 2,24E+05 | 1,043E-03 | 4,66 |
| | E163-1 | n.c. | n.c. | 34,50 |
| | E163-2 | 3,79E+05 | 1,200E-03 | 3,16 |
| mCCL21 | E163 | 2,22E+06 | 1,877E-03 | 0,85 |
| | E163-2 | 5,30E+06 | 2,262E-02 | 4,26 |
| mCCL24 | E163 | 3,45E+06 | 2,559E-03 | 0,74 |
| | E163-2 | 6,44E+06 | 5,000E-02 | 7,69 |
| hCCL21 | E163 | | | 12,7* |
| | E163-5 | 1,89E+05 | 8,700E-04 | 4,59 |

Tabla 7. Cálculo de los parámetros cinéticos (K_a, K_d y K_D) de unión a CKs de E163, E163-1 a E163-5 por SPR. K_a, constante de asociación; K_d, constante de disociación; K_D, constante de afinidad; n.c.: no calculado. Los sensorgramas se ajustaron a un modelo global de Langmuir 1:1. *: Dato publicado en Ruiz-Argüello *et al.*, 2008.

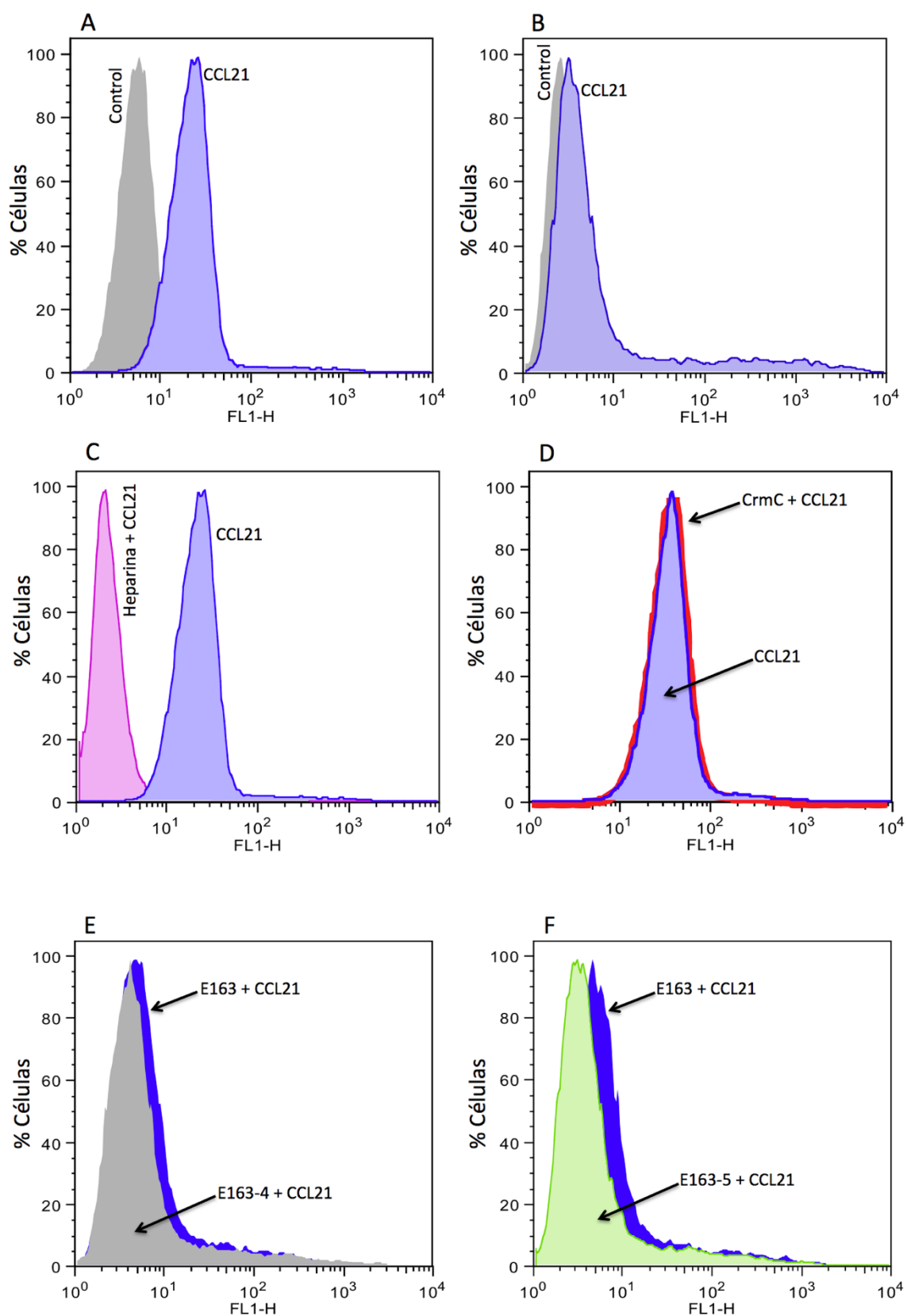
4.1.3 La proteína E163 oligomeriza

4.1.3.1 Cromatografía de exclusión molecular de E163

La proteína E163 tiene una masa molecular de 31 kDa y es una glicoproteína que está N-glicosilada en el aminoácido 75 (Asn-Xaa-Ser/Thr que corresponde a la secuencia de aminoácidos NIS) según el programa de predicción *NetNGlyc 1.0 Server*. Con la finalidad de comprobar y verificar la masa molecular y/o la presencia de algún oligómero de E163 realizamos una cromatografía de exclusión molecular. Para ello, la proteína recombinante E163 purificada se analizó en una columna de exclusión por tamaño molecular (Superdex 200) acoplada a un aparato de cromatografía AKTA-HPLC y se detectó la absorbancia a 280 nm. La columna se calibró utilizando un conjunto de patrones de calibración de media masa molecular (12-200 kDa). E163 eluyó en 2 picos, el primero de 17-23 ml que corresponde a un tamaño de <165-142 kDa. El segundo pico de elución fue en el rango 37-52 ml y tiene un hombro que va de 45 a 52 ml.

El último pico corresponde con un tamaño molecular de <70-33 kDa (Fig. 19). Analizamos por WB algunas de éstas fracciones empleando el Ab anti-V5 presente en la proteína recombinante E163 y detectamos la presencia de la proteína en ambos picos descritos (Fig. 19). En el primer pico sólo vimos la aparición de una banda de <33 kDa aproximadamente, sin embargo, en el segundo pico, las eluciones de 39-45 ml, detectamos 2 bandas, una de <33 kDa que correspondería a un monómero y una segunda banda de <66 kDa aproximadamente, que correspondería a un dímero. Aunque las condiciones en las que hemos realizado la electroforesis en gel son desnaturizantes (SDS-PAGE) seguimos observando la interacción entre las proteínas. La proteína E163 es capaz de dimerizar y el primer pico podría ser consecuencia de proteína

agregada o a que cargamos menor cantidad de proteína en el gel y por ello no se detectó bandas superiores a <33 kDa.



G

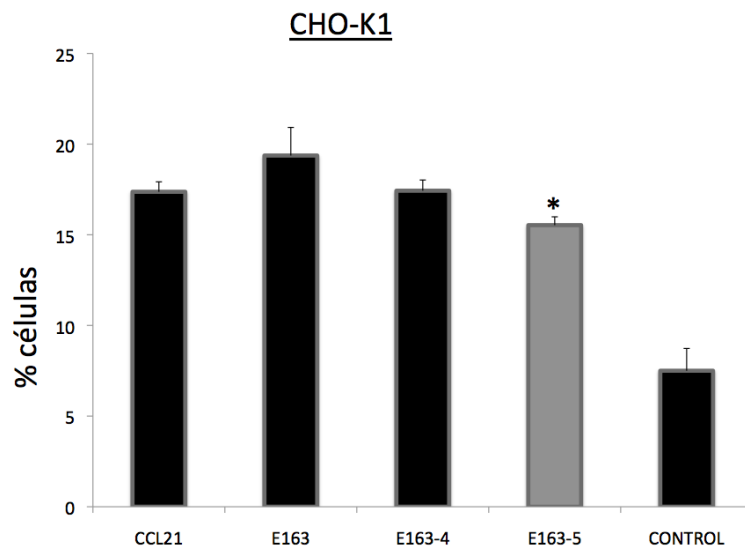


Fig. 18. Ensayo de unión a superficie celular de hCCL21 biotinilada por citometría de flujo. A-F) Histogramas del análisis de unión. Detectamos la unión con Avidina conjugada con Fluoresceína. Los ensayos se realizaron en células CHO-K1 a excepción del apartado B) que se realizó en células CHO-618. Los colores representan: A y B) Gris, proteína control biotinilada; azul claro, hCCL21 biotinilada. C y D) Rosa, heparina + hCCL21; azul claro, hCCL21 y rojo, hCCL21 + CrmC. E y F) Azul, E163 + hCCL21; gris, E163-4 + hCCL21 y verde, E163-5 + hCCL21. G) Se muestra la media del porcentaje de unión de cada muestra (n=3) y la desviación estándar. El asterisco (*) indica que hay una diferencia significativa ($p < 0,05$) comparado con la incubación de CCL21 aislada.

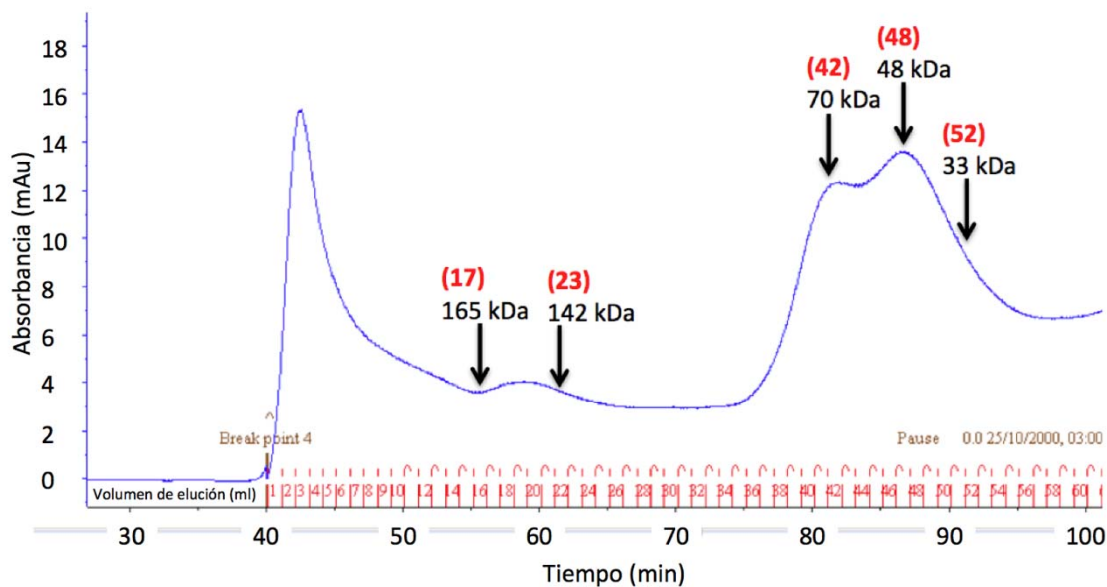


Fig. 19. Cromatograma obtenido por exclusión molecular de E163. En rojo indicamos el volumen de elución a partir del volumen de vacío (40 ml) y en negro la masa molecular correspondiente a cada pico (kDa).

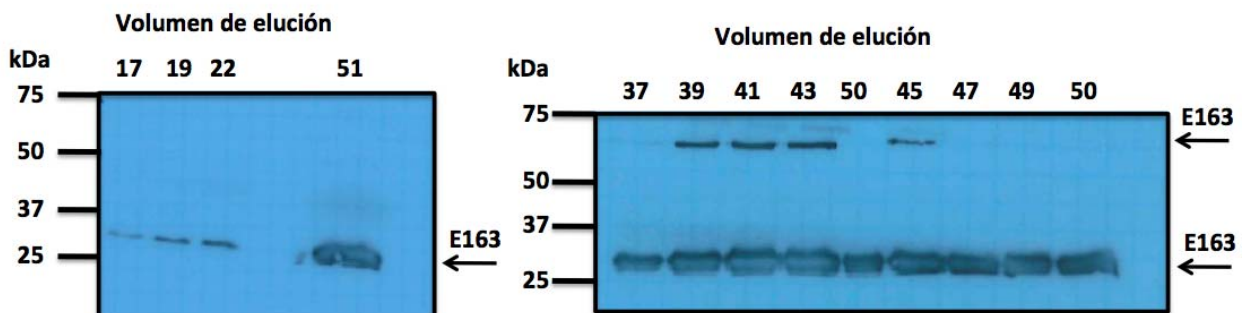


Fig. 20. Fracciones recogidas en la cromatografía de exclusión molecular de E163. Se muestra un WB utilizando anti-V5 con los 2 picos obtenidos por exclusión molecular (17-23 y 37-52 ml). A la izquierda de cada WB se indican los marcadores de masa molecular en kDa y la flecha de la derecha indica la proteína E163. Se indica el volumen de elución.

4.1.3.2 Ensayo de interacción de E163 consigo misma por SPR

Para determinar la posible oligomerización de la proteína E163, acoplamos a un *chip* CM4 320 RUs de E163. Pasamos como analito 2 concentraciones (250 y 500 nM) de E163, 35kDa de CPXV-Cheetah y de BSA comercial. Se pudo observar que la proteína E163 se une a sí misma pero las proteínas 35 kDa de CPXV y BSA no se unen.

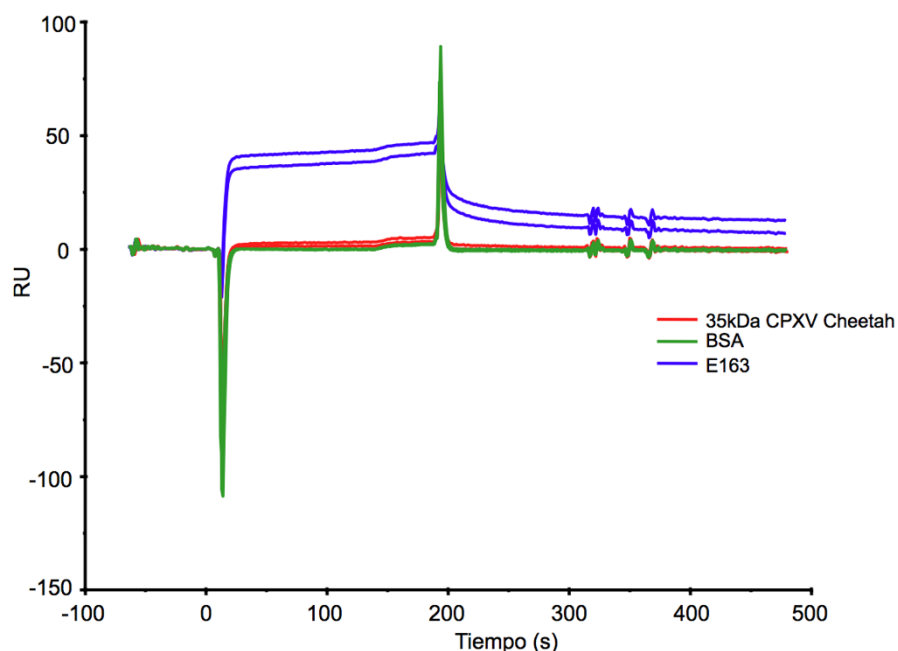


Fig. 21. Sensorgrama del ensayo de interacción de E163 consigo misma. Utilizamos E163 como ligando y como analito. Las proteínas 35-kDa y BSA se utilizaron como control negativo. El tiempo de contacto fue de 3 min con una velocidad de flujo de 10 μ l/min. Seguimos la disociación durante 2 min.

4.2 35-kDa *in vitro*

4.2.1 Clonaje y expresión de la proteína 35-kDa de ECTV

Hemos clonado el gen *35kDa* de ECTV (*EVN001*) en un plásmido apropiado para su posterior expresión en el sistema de baculovirus generando el vector pHH12 (Tabla 2). Hemos transfectado células *Hi5* con pHH12 generando el baculovirus recombinante que expresa la proteína 35-kDa (vHH12). En un primer pase 0, ya observamos la expresión de la proteína (Fig. 22A). A continuación realizamos una prueba de expresión infectando células *Hi5* a diferentes moi (5 y 10 ufp/célula) y recogiendo dichas infecciones a distintas hpi para conseguir el máximo rendimiento en la expresión de nuestra proteína (Fig. 22B). Las infecciones se realizaron finalmente a moi 5 y se recogieron a 72 hpi.

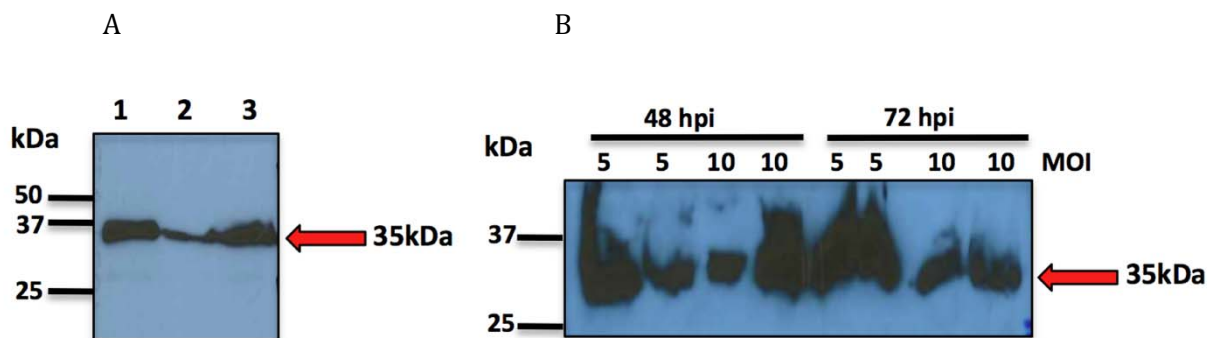


Fig. 22. Expresión de la proteína 35-kDa ECTV en el sistema de baculovirus. A) WB donde cargamos el SN de 3 infecciones de baculovirus recombinantes que expresan la proteína 35-kDa (vHH12) en un pase 0. Carriles: 1, 2 y 3: 3 clones de vHH12. B) WB del SN de infecciones con 2 clones diferentes de vHH12. Se realizaron las infecciones a mois 5 y 10, recogándose a las 48 y 72 hpi. A la izquierda de cada WB están los marcadores de masa molecular (kDa). La flecha de la derecha indica la proteína 35-kDa. Hemos utilizado el Ab anti-PentaHis.

4.2.2 Purificación y cuantificación de la proteína 35-kDa de ECTV

Infectamos 10^8 células *Hi5* en suspensión con un pase 2 del baculovirus recombinante (vHH12) a alta moi (2-5 ufp/célula). A las 72 hpi se recogió la infección. Realizamos el mismo procedimiento indicado en apartado 4.1.1.4 de resultados. La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad a níquel. Se eluyó la proteína con 50 mM fosfato sódico (pH 7,4), 300 mM NaCl y concentraciones crecientes de imidazol (40, 60, 100 y 250 mM), recogiendo fracciones de 600 μ l - 1 ml. A continuación, cada fracción fue analizada por SDS-PAGE, y las alícuotas con mayor pureza (3-8) (Fig. 23A) se juntaron y se concentraron hasta un volumen final de 100-200 μ l que se guardó a -20°C para su uso en los experimentos posteriores. La cuantificación de dichas alícuotas se realizó con curvas patrón de BSA (Fig. 23B).

4.2.3 Alineamiento de secuencias de la vCKBP 35-kDa de poxvirus

La proteína 35-kDa MT1 de MYXV es una vCKBP que une GAGs (Seet et al., 2001a). Los residuos descritos en este trabajo como responsables de la unión a GAGs son TRRSHI y LKVKNKGL (Fig. 24). Realizamos un alineamiento de secuencias entre las proteínas ortólogas 35-kDa de MYXV, CPXV, VACV y ECTV para conocer los posibles residuos o zonas conservadas respecto de la proteína M-T1 y poder señalar posibles zonas de unión a GAGs no descritas en estas vCKBPs. No están conservadas las secuencias de unión a GAGs de MT-1 en el resto de proteínas homólogas pero nosotros hemos marcado con flechas

residuos básicos (Fig. 24) próximos a dichas secuencias que pudieran ser responsables de interaccionar con GAGs.

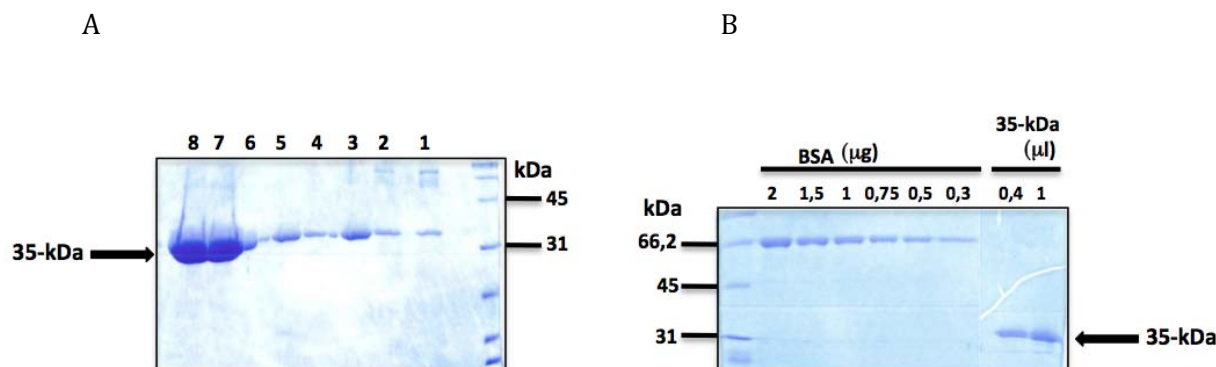


Fig. 23. Purificación y cuantificación de la proteína 35-kDa de ECTV. A) Purificación por cromatografía de afinidad a níquel Ni-NTA. SDS-PAGE teñido por Coomassie dónde se cargaron las diferentes eluciones obtenidas durante la purificación (carriles: 1-2, 40 mM; 3-4, 60 mM; 5-6, 100 mM; 7-8, 250 mM). B) SDS-PAGE teñido con Coomassie de la cuantificación de la proteína 35-kDa. Indicamos la cantidad de BSA (µg) y el volumen de la proteína 35-kDa (µl). Se indican los marcadores de masa molecular (kDa) y con una flecha la posición de la proteína 35-kDa. Calculamos una concentración de 1,9 µg/µl para la proteína 35-kDa.

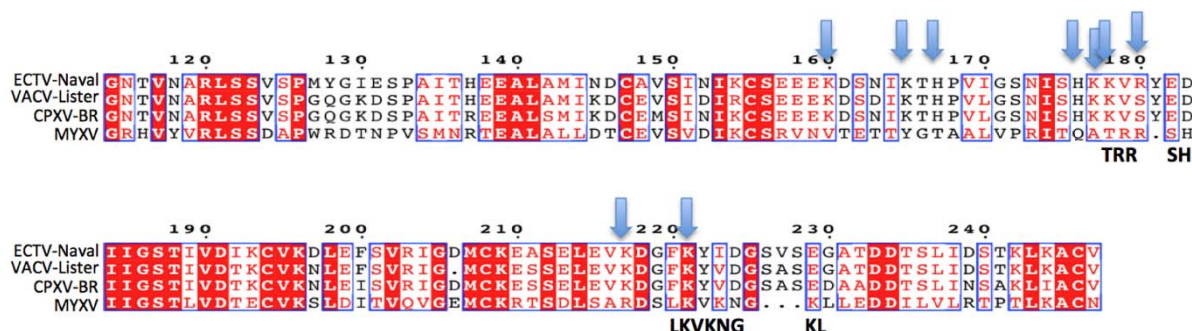


Fig. 24. Alineamiento de secuencias entre las proteínas 35-kDa de ECTV, VACV, CPXV y MYXV. Realizamos el alineamiento de secuencias con CLUSTALW seguido de *ESPrpt 3*, de 35-kDa ECTV Naval (001EVN), Proteína 35-kDa VACV-Lister (AC: ABD52710), 35-kDa CPXV-BR (AC: Q85307) y M-T1 MYXV-Lausanne (AC: Q9PX83). Las cajas rojas indican residuos conservados y las cajas blancas residuos parecidos. Las flechas azules indican residuos básicos como posibles zonas de unión a GAGs. Las secuencias TRRS y LKVKNGKL son zonas de unión a GAGs en la proteína 35-kDa MYXV (Seet et al., 2001a).

4.2.4 Ensayo de unión a GAGs por SPR

Para conocer si alguna de las proteínas 35-kDa de ECTV y CPXV se unen a GAGs realizamos ensayos de interacción con heparina por SPR. Para ello acoplamos a un *chip* CM4 ~10 RUs de heparina biotinilada, inyectamos como analitos las proteínas B18 de VACV, E163, 35-kDa ECTV, 35-kDa CPXV-Cheetah y 35-kDa CPXV-BR a una velocidad de 10 µl/min. Lo que observamos es que los controles positivos (B18 VACV y E163) se unen a GAGs pero, además, también lo hace la proteína 35-kDa CPXV-BR. Sin embargo, no se detectó unión de las proteínas 35-kDa ECTV ni 35-kDa CPXV-Cheetah (Fig. 25).

4.2.5 Ensayos de unión a GAGs por citometría de flujo

Queríamos saber si las proteínas 35-kDa de ECTV y CPXV son capaces de unirse a una superficie celular mediada por GAGs. Para ello incubamos las proteínas 35-kDa de CPXV-Cheetah, 35-kDa de CPXV-BR y 35-kDa de ECTV con 300.000 células CHO-K1 por punto. Como Ab primario empleamos anti-PentaHis.

Vimos que ninguna de las proteínas testadas se unía a la superficie celular (Fig. 26A) a excepción de nuestro control positivo, la proteína B18 de VACV. Realizamos un segundo experimento con las mismas condiciones descritas aunque cambiando el Ab. Utilizamos un Ab policlonal anti-35kDa (Fig. 26B) y volvimos a obtener el mismo resultado negativo en todos los casos a excepción del control positivo (B18 de VACV).

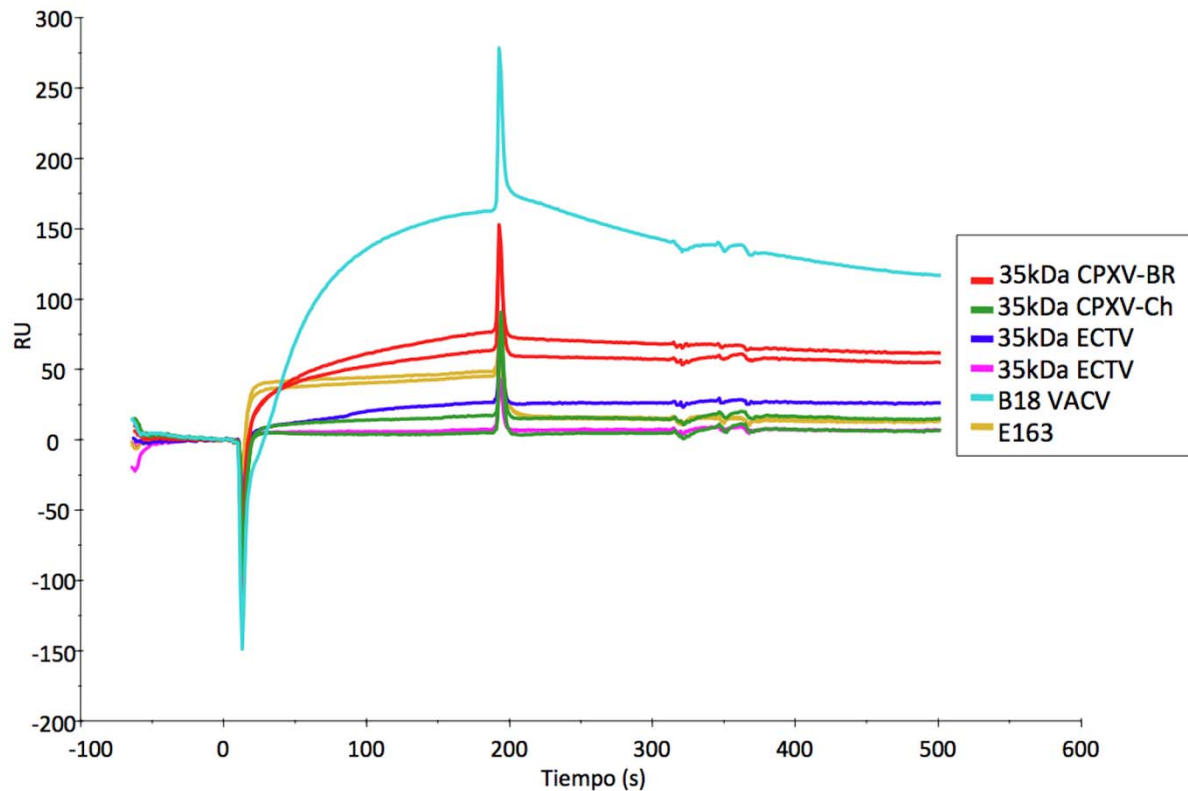
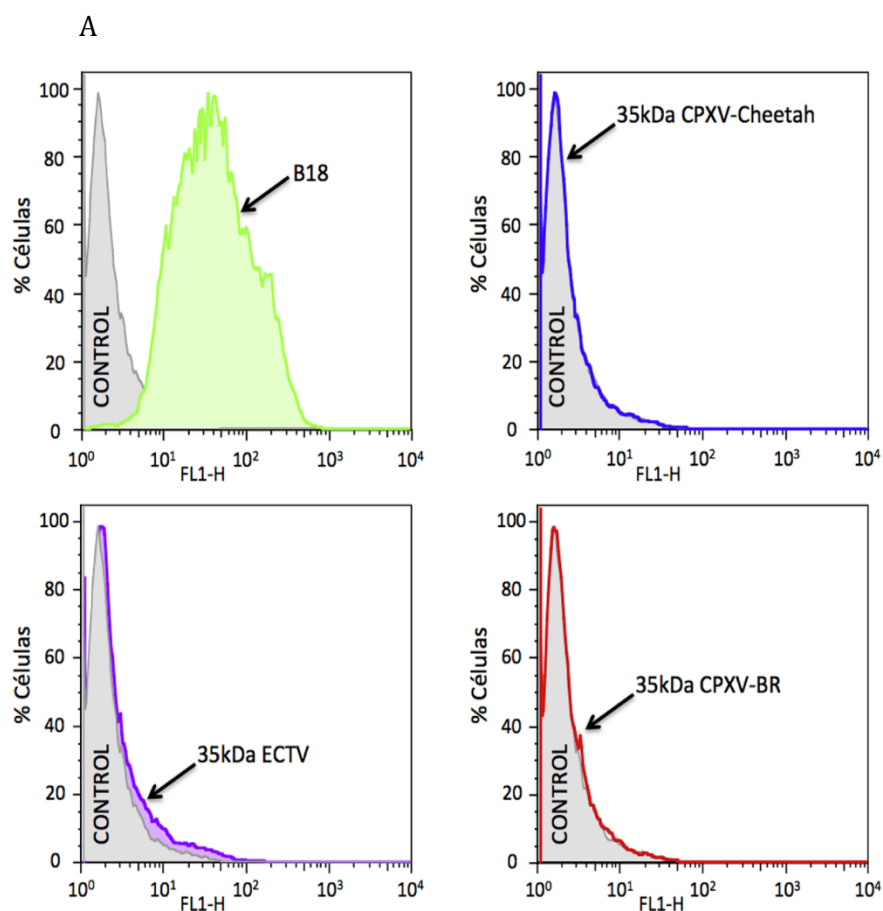


Fig. 25. Ensayo de unión de la proteína 35-kDa a GAGs por SPR. Generamos una superficie sintética de heparina en un *chip* CM4 acoplado ~10 RUs. Inyectamos a una velocidad de 10 μ l/min las proteínas B18 de VACV (250 nM), E163 (250 y 500 nM), 35-kDa ECTV (250, 500 y 1000 nM), 35-kDa CPXV-Cheetah (250 y 500 nM) y 35-kDa CPXV-BR (250 y 500 nM). Monitorizamos la asociación durante 3 min y la disociación durante 2 min.

4.2.6 Mecanismo de acción de la vCKBP 35-kDa en superficie celular con CK biotinilada

Para ahondar en el mecanismo de acción de las vCKBPs 35-kDa de CPXV y ECTV realizamos ensayos por citometría de flujo donde unimos la CK biotinilada, hCCL21, a una superficie celular con GAGs representada por las células CHO-K1. Incubamos las diferentes vCKBPs con hCCL21 en las células. Lo que observamos es que las 3 vCKBPs son capaces de impedir la interacción de la CK con la superficie celular a través de GAGs (Fig. 27H) de un modo significativo. Observamos que la CK CCL21 se une a la superficie celular (Fig. 27A) y que en los experimentos de unión realizados con células que no expresan GAGs (CHO-618) no hay unión (Fig. 27B). También realizamos un experimento de competición con H y lo que observamos es que la CK pierde la unión a la superficie celular en presencia de un exceso de H (Fig. 27C). Cuando incubamos la proteína CrmC de ECTV en presencia de CCL21 o CCL21 independientemente, no observamos ninguna diferencia en la unión a GAGs de la CK (Fig. 27D). Sin embargo, cuando incubamos las proteínas 35kDa de ECTV (Fig. 27G), CPXV-Cheetah (Fig. 27F) y CPXV-

BR (Fig. 27E) en presencia de la CK observamos que las vCKBPs son capaces de inhibir la unión de la CK biotinilada a la superficie celular de un modo significativo (Fig. 27H) cuando lo comparamos a la CK aislada.



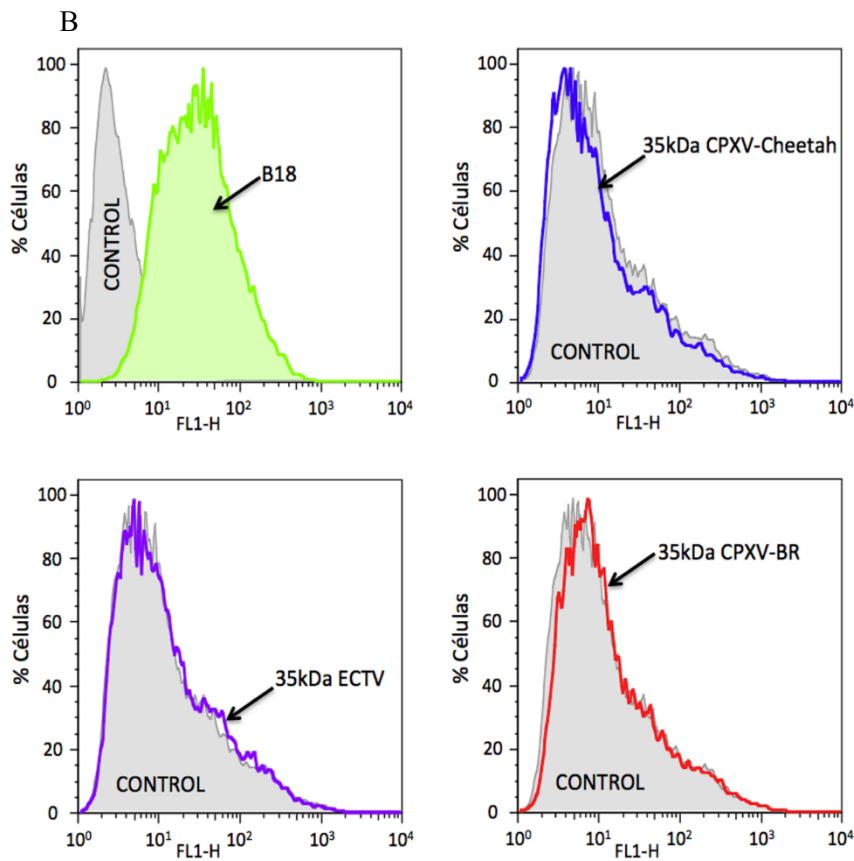
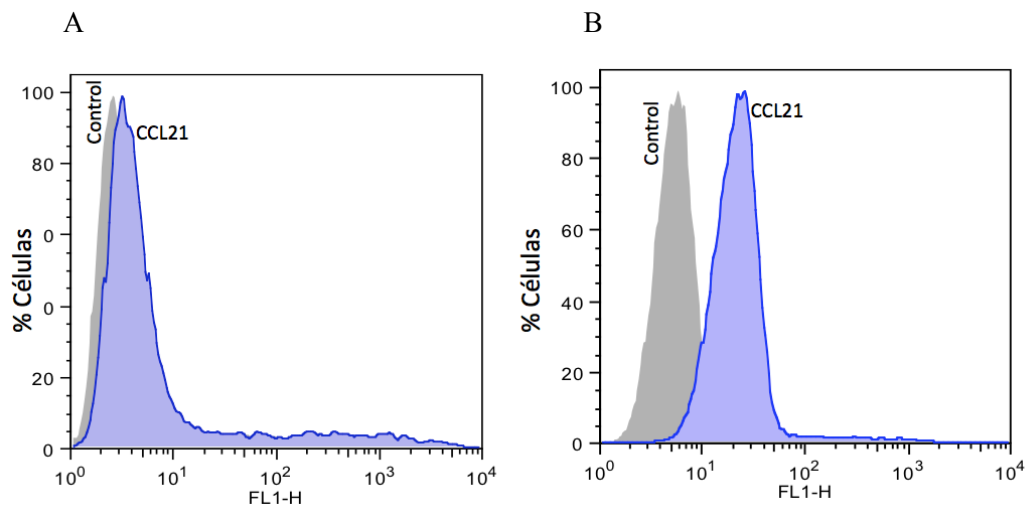


Fig. 26. Ensayo de unión a GAGs de la proteína 35-kDa por citometría de flujo. Incubamos las proteínas 35-kDa de ECTV, 35-kDa de dCPXV-BR, 35-kDa de CPXV-Cheetah y B18 de VACV a una concentración final de 250 nM con 300.000 células CHO-K1 por punto. Realizamos un triplicado con cada proteína. Los colores indican: Gris, control negativo; verde, B18 VACV; azul, 35-kDa CPXV-Cheetah; morado, 35-kDa ECTV y rojo, 35-kDa CPXV-BR. A) Utilizamos el Ab primario anti-PentaHis B) Empleamos el Ab anti-35-kDa.



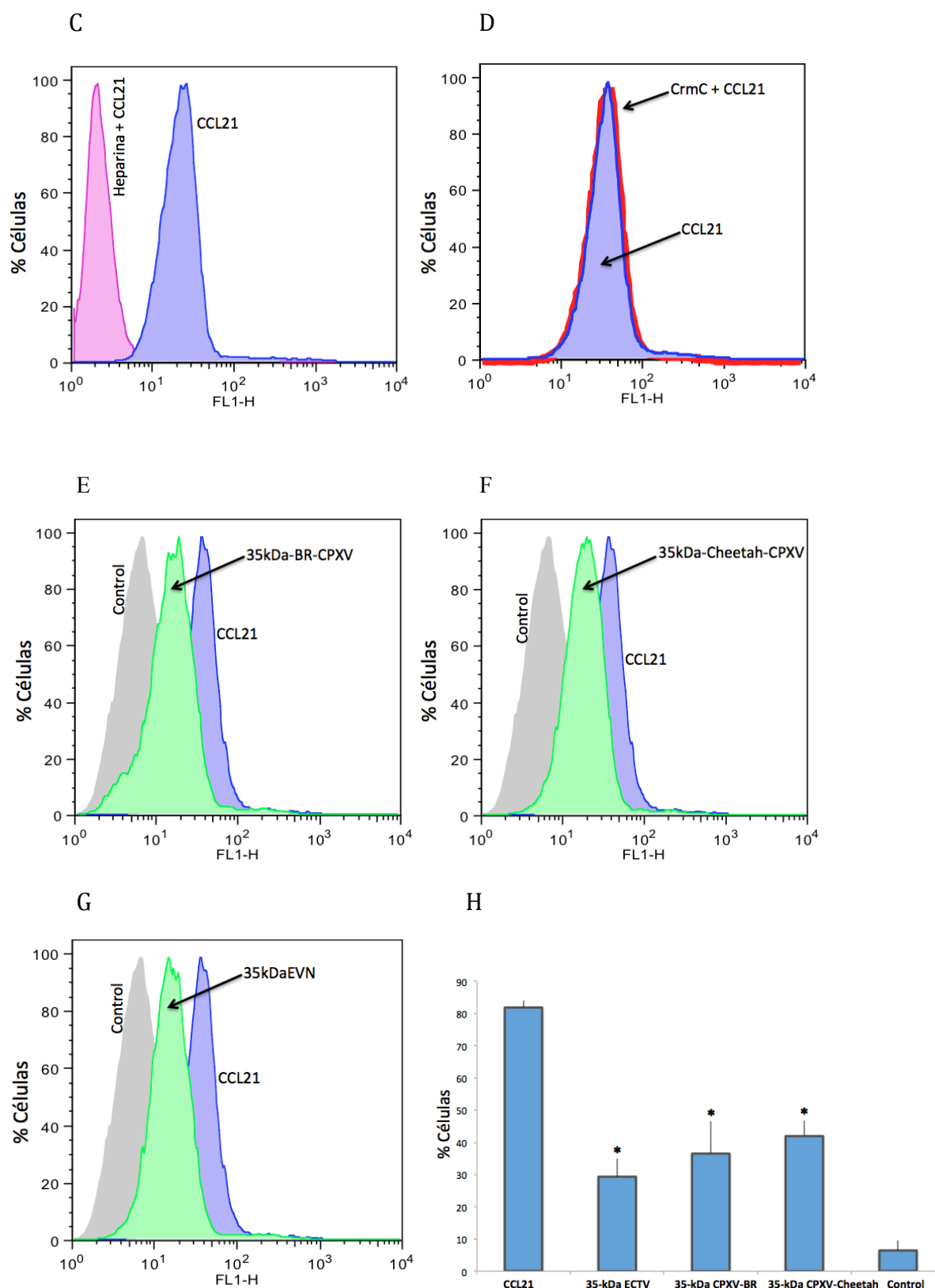


Fig. 27. Ensayo de unión de 35-kDa a CK biotinilada. Incubamos las proteínas 35-kDa de CPXV-BR (E), 35kDa de CPXV-Cheetah (F), 35kDa de ECTV (G), CrmC de CPXV (D) con CCL21. Analizamos por citometría de flujo 20.000 eventos por punto. Utilizamos Avidina-fluoresceína en la detección. En A) se han empleado células CHO-618. De B-G) células CHO-K1. En C) se ha realizado un ensayo de competición con H. H) Los experimentos se realizaron por triplicado y mostramos la media con su desviación estándar en cada caso. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas cuando se compara con la CK hCCL21 aislada.

4.3 E163 *in vivo*

4.3.1 Generación de virus recombinantes delecionados en el gen *E163* (*EVN163*) de ECTV

Para investigar el posible papel de la proteína E163 en la patogénesis de *mousepox*, hemos generado mediante la técnica de selección de virus dominantes transitorios para ECTV, el virus recombinante delecionado en el gen *E163* (ECTVΔ*E163*) (ver punto 3.12) (Fig. 28A). En un primer paso de infección-transfección, usamos el vector pALO4 que contiene las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen *E163*, además del gen de resistencia a puromicina (PAC) y el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP), e infectamos con ECTV a una moi baja (0,01-0,1 ufp/célula). En un primer proceso de recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes del gen *E163* presentes en el vector y el virus parental, se generan virus recombinantes que han insertado todo el vector en su genoma. Tras 3 dpi, se recogieron las células infectadas y se dieron 4 pases sucesivos en presencia de puromicina (Fig. 28B) donde buscamos el enriquecimiento en el virus recombinante. El virus transitorio dominante tiene insertado en su genoma los genes *PAC* y *EGFP*. Tras los pases en puromicina, se infectaron cultivos en ausencia de la droga con objeto de seleccionar virus recombinantes que dan lugar a placas verdes y contienen el vector insertado. En nuestro caso, obtuvimos 4 placas verdes (g1-g4) que fueron chequeadas por PCR con oligonucleótidos adecuados que lo diferencian del virus parental (Fig. 29 y 30A). La realización de 4 a 5 pases sucesivos en ausencia de puromicina permite un segundo evento recombinatorio donde el virus expulsa el plásmido de su genoma dando lugar al mutante de deleción ECTVΔ*E163* o al virus parental. Tras cada pase en ausencia de puromicina, se realizó una infección en medio semisólido y picamos placas blancas (w) que chequeamos por PCR antes de llevar a cabo el siguiente pase de purificación por aislamiento de placa (Fig. 30A). Se analizaron por PCR las regiones colindantes 5' y 3' del gen *E163* en nuestro virus recombinante con la finalidad de descartar mutaciones en los puntos de recombinación (Fig. 30B y C). Finalmente, ECTVΔ*E163* procede de la placa g4.7w1.4.4.14. La Fig. 29 muestra la evolución de placas picadas y analizadas por PCR hasta llegar a la selección del virus delecionado. Se generaron reservas de trabajo de alto título y preparaciones de virus semi-purificado por colchón de sacarosa para su posterior uso en los experimentos *in vivo*.

4.3.2 La proteína E163 no se expresa en una infección con ECTVΔ*E163*

Con la finalidad de verificar la ausencia de expresión de E163 en una infección con ECTVΔ*E163*, se infectaron células BS-C-1 a una moi 2-4 ufp/célula y el SN se recogió a 48 hpi, se inactivó y se concentró 20 veces (Materiales y Métodos, sección 3.9). Como control se realizaron infecciones con ECTV y ECTV35kDa-mut. Análisis por WB con Ab específicos contra E163 demostró la ausencia de expresión de E163 en el virus delecionado (Fig. 31A). Un análisis por WB usando Ab que reconocen la proteína CrmD de ECTV mostró que una vCKBP diferente se expresa en ECTVΔ*E163* (Fig. 31B), en ECTV y en ECTV35kDa-mut (Fig. 31C).

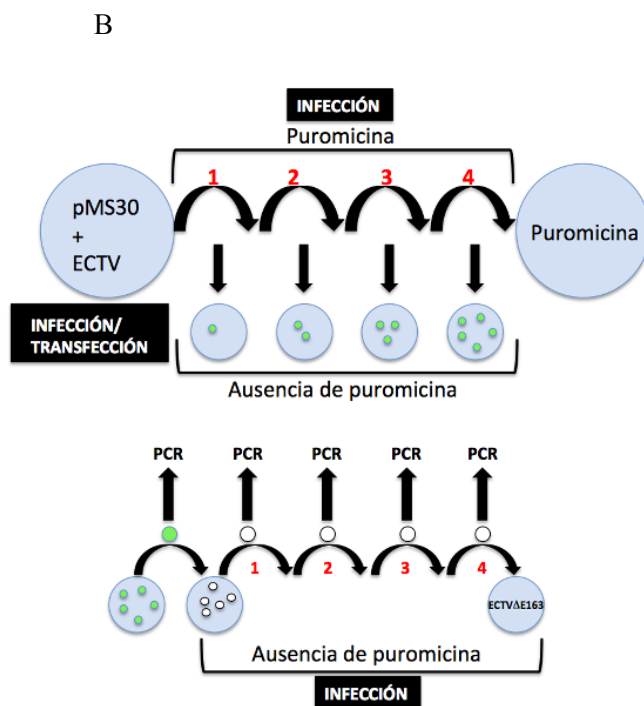
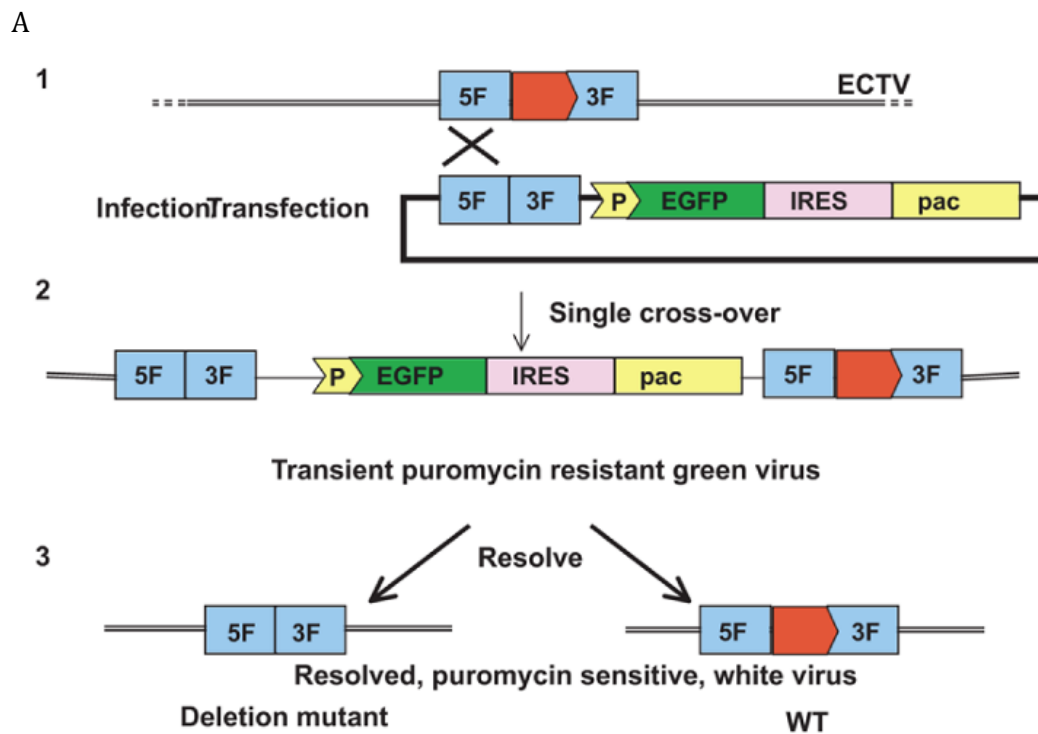


Fig. 28. Representación esquemática de la generación de ECTV recombinantes por el método de la selección dominante transitoria. A) Eventos de recombinación que ocurren en la generación de los virus recombinantes (figura adaptada de (Alejo et al., 2009). 1: Infección-transfección, primera recombinación homóloga entre ECTV y el plásmido con los genes marcadores y las regiones 5' y 3' del gen de interés. 2: Se generan virus recombinantes transitorios dominantes en una infección en presencia de puromicina. 3: Segunda recombinación homóloga, el virus pierde el plásmido y se resuelve en un virus de delección o en el parental. B) Selección de los virus recombinantes en cultivo. Tras la infección-transfección, se dan 4 pases en presencia de puromicina. Tras cada pase de puromicina se plaquea el extracto celular en medio semisólido y se observa el aumento en número de placas verdes. Las placas verdes se pican y se analizan por PCR con oligonucleótidos apropiados que diferencian el virus recombinante del parental. Aquellas placas que corresponden a virus recombinantes correctos se someten a 4 pases consecutivos de purificación por aislamiento de placa y se comprueba por PCR.

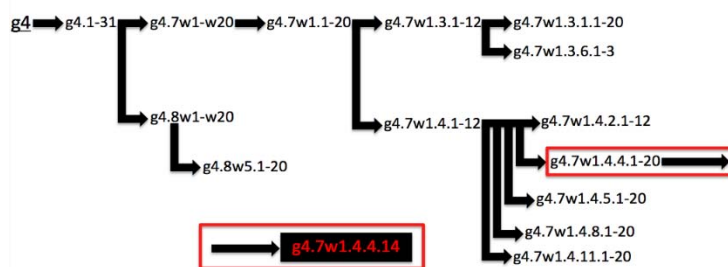


Fig. 29. Placas verdes y blancas seleccionadas en la generación de ECTVΔE163. Esquema del número de placas verdes (g) y blancas (w) picadas y analizadas por PCR partiendo de la placa g4 inicial y de la que seleccionamos ECTVΔE163. A la placa g4 le dimos un pase más en presencia de puromicina. Tras plaquearlo picamos 31 placas (g4.1-31). Después llevamos a cabo 4 rondas sucesivas de crecimiento en cultivo plaqueando en medio semisólido hasta obtener la placa g4.7w1.4.4.14 que originó el virus deleciónado.

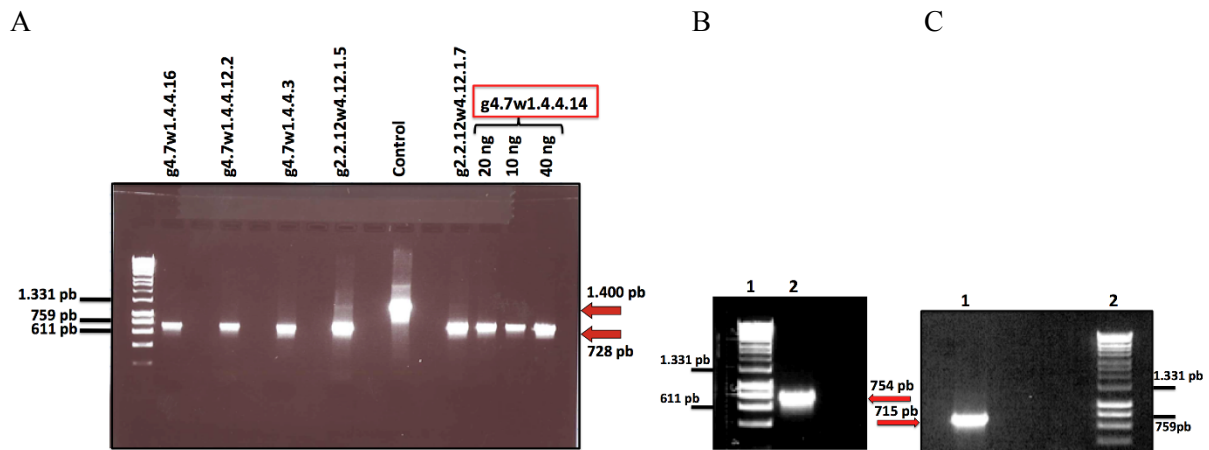


Fig. 30. Comprobación por PCR de las placas blancas seleccionadas en la generación de ECTVΔE163. A) Gel de agarosa que muestra los productos de amplificación por PCR de placas blancas en la generación de ECTVΔE163. Amplificación por PCR con los oligonucleótidos EN163-5 y EN163-6 específicos del gen *E163* para poder diferenciar virus deletado (fragmento de 728 pb) o parental (fragmento de 1.400 pb). B) y C) Análisis de las regiones 5' y 3' colindantes al gen *E163* en ECTVΔE163. B) Gel de agarosa con el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos 4S-E163 y 4AS-E163. Se muestra los marcadores de masa molecular indicados en pb (1) y el producto de PCR de 754 pb de la región colindante 5' del gen *E163* (2). C) Gel de agarosa con el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos 5S-E163 y 5AS-E163 (Tabla 4). Se muestra el producto de PCR de la región colindante 3' del gen *E163* con una banda de 715 pb (1) y los marcadores de masa molecular indicados en pb (2).

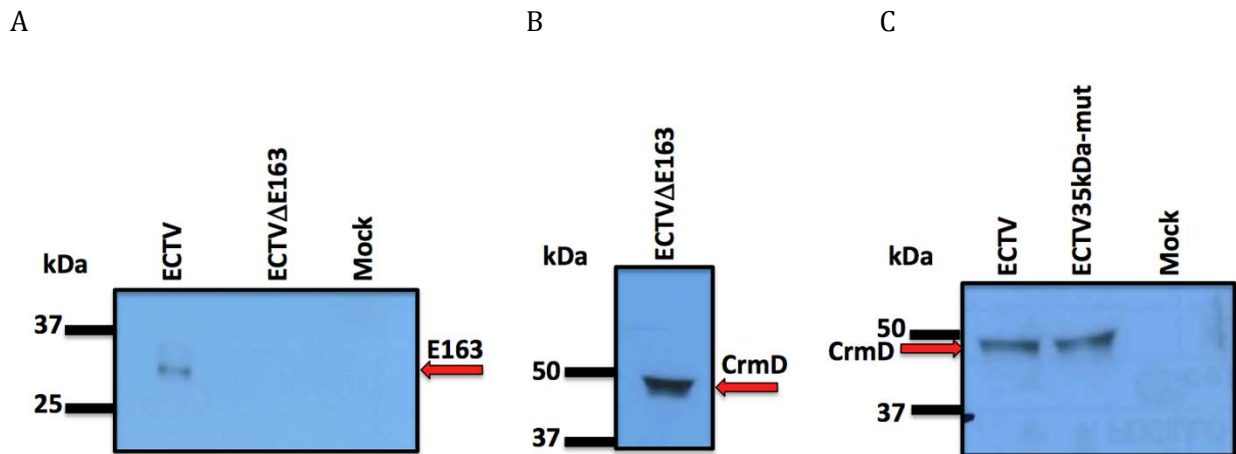


Fig. 31. Expresión de las vCKBPs E163 y CrmD en infecciones con ECTVΔE163, ECTV y ECTV35kDa-mut. Monocapas de células BS-C-1 se infectaron con ECTVΔE163, ECTV o ECTV35kDa-mut y se prepararon a las 48 hpi SN inactivados y concentrados. Como control se utilizaron cultivos no infectados (mock). Se muestra el WB de los SN indicados utilizando Ab específicos contra E163 (A) o CrmD (B, C). Marcadores de masa molecular están situados a la izquierda (kDa).

4.3.3 Secuenciación del genoma de ECTVΔE163

Con el objetivo de comprobar la ausencia de otras mutaciones que difieran de la delección del gen *E163* en el genoma de ECTV, secuenciamos todo el genoma de ECTVΔE163 por secuenciación masiva utilizando la tecnología de Illumina. El virus recombinante se amplificó en células BS-C-1 y se purificaron las partículas virales por colchón de sacarosa (3.13 y 3.16 de Materiales y Métodos). El DNA viral fue amplificado con la enzima de *Phi29*, se generó una biblioteca de TruSeq y se secuenció con la técnica de Illumina en un equipo HiSeq. Se obtuvieron 1.287.025 millones de secuencias de extremos apareados 2 x 101 bp. El tamaño medio de lectura fueron 101 bp. La cobertura total del genoma fue de 1.075x (Tabla 8)

Éstas secuencias se ensamblaron con el programa CLC-Genomics Workbench 5.5.1, mapeando las lecturas en el genoma de referencia de ECTV Naval. El gen *E163* tiene 617 pb y abarca la posición genómica 155.709-156.380. En el análisis encontramos una cobertura = 0, entre las posiciones genómicas que van desde el nucleótido 155.704 al 156.379, ambos incluidos (Fig. 32). Además, utilizando el programa Artemis (Wellcome Trust Sanger Institute) (Rutherford et al., 2000), encontramos una mutación puntual (A→G) en la posición genómica 169.337 que corresponde al pseudogen E178P (Fig. 33) y no es una secuencia codificante. A ambos extremos del genoma de poxvirus se sitúan las ITRs que incluyen zonas ricas en A+T y zonas cortas de repeticiones invertidas, son regiones difíciles de secuenciar por lo que obtuvimos lecturas a partir del nucleótido 172 y hasta el 207.445 del genoma de ECTVΔE163. Podemos concluir que ECTVΔE163 tiene deletado el gen *E163* y que no tiene otras mutaciones que alteren la expresión de otro gen en todo su genoma.

| | | Tamaño medio | Bases totales |
|-----------------------|-----------|--------------|---------------|
| Lecturas obtenidas | 2.574.050 | 101 | 259.979.050 |
| Alineadas | 2.211.770 | 101 | 223.388.770 |
| No alineadas | 362.280 | 101 | 36.590.280 |
| Referencias | 1 | 207.620 | 207.620 |
| Lecturas apareadas | 1.282.264 | 398,15 | |
| Lecturas no apareadas | 929.506 | 101 | |

Tabla 8. Ensamblaje de las lecturas obtenidas por Illumina. Con el programa CLC-Genomics Workbench 5.5.1 se mapearon las lecturas con el genoma de referencia ECTV Naval.

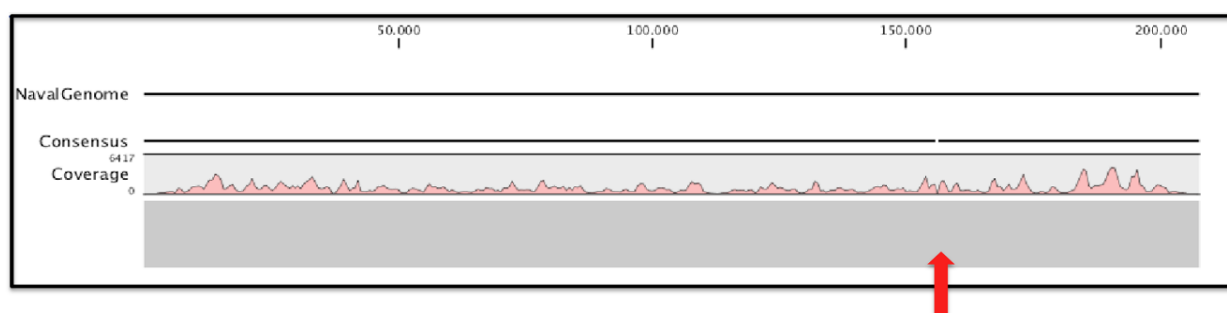


Fig. 32. Representación gráfica de la cobertura del genoma. Obtenida con el programa CLC-Genomics. La flecha indica la delección del gen *E163*.

4.3.4 La proteína E163 de ECTV no está implicada en la replicación ni en la dispersión viral

Realizamos un ensayo de replicación viral *in vitro* para analizar la capacidad de infectar un cultivo celular mediante un ciclo único de infección (durante 24 hpi) o progresar durante varios ciclos de infección (durante 72 hpi), de ECTVΔE163 frente a ECTV. Para ello infectamos a alta moi (5 ufp/célula) una monocapa de células BS-C-1 y titulamos la progenie viral generada a diferentes tiempos de infección (Fig. 34A). A las 3 hpi se apreció una bajada del título viral que corresponde a la fase de eclipse.

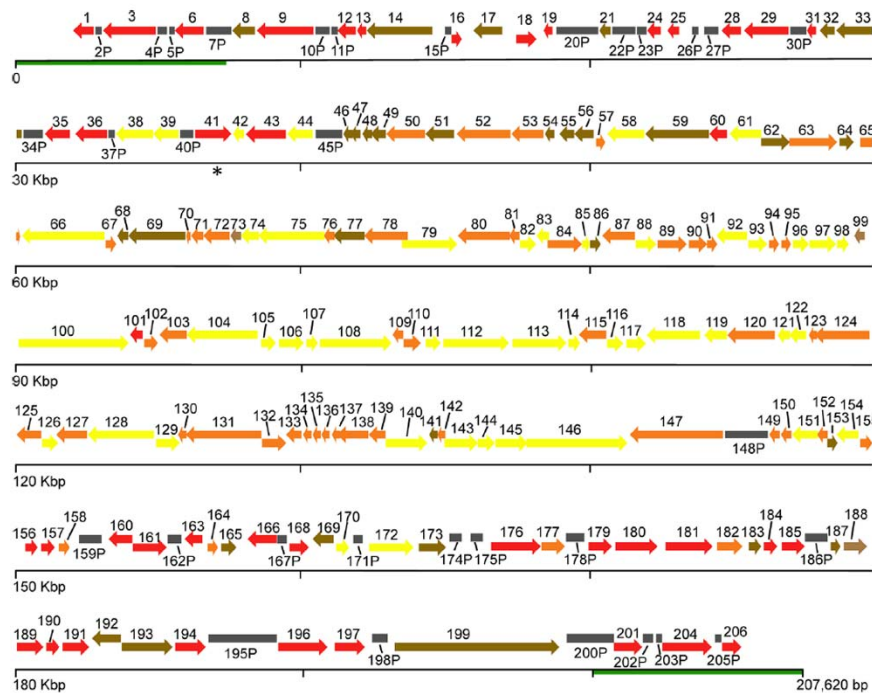


Fig. 33. Representación esquemática de la organización del genoma de ECTV Naval Las flechas indican genes. Rojo, genes de interacción con el sistema inmune e inmunomoduladores; amarillo, metabólicos; naranja, proteínas implicadas en morfogénesis y estructurales; marrón, función desconocida. Los pseudogenes (P) se indican cómo rectángulos grises. Las líneas verdes indican las TRIs. Figura de la publicación Mavian, et al., 2014.

A las 24 hpi se detectó un aumento de aproximadamente dos órdenes de magnitud en ambos virus aunque ECTV tenía un título ligeramente inferior a ECTVΔE163 en este experimento. También realizamos una infección a baja moi (0,01 ufp/célula) donde seguimos el progreso de la infección durante 72 hpi (Fig. 34B). A las 24 hpi el título viral aumentó cerca de dos órdenes de magnitud, ECTV presentó un título viral ligeramente superior a ECTVΔE163 en este caso. La progenie viral aumentó cerca de tres órdenes de magnitud, a las 48 hpi y a partir de este tiempo se estabilizó. Podemos concluir con estos experimentos que la proteína E163 no está implicada en la replicación ni en la dispersión viral *in vitro*.

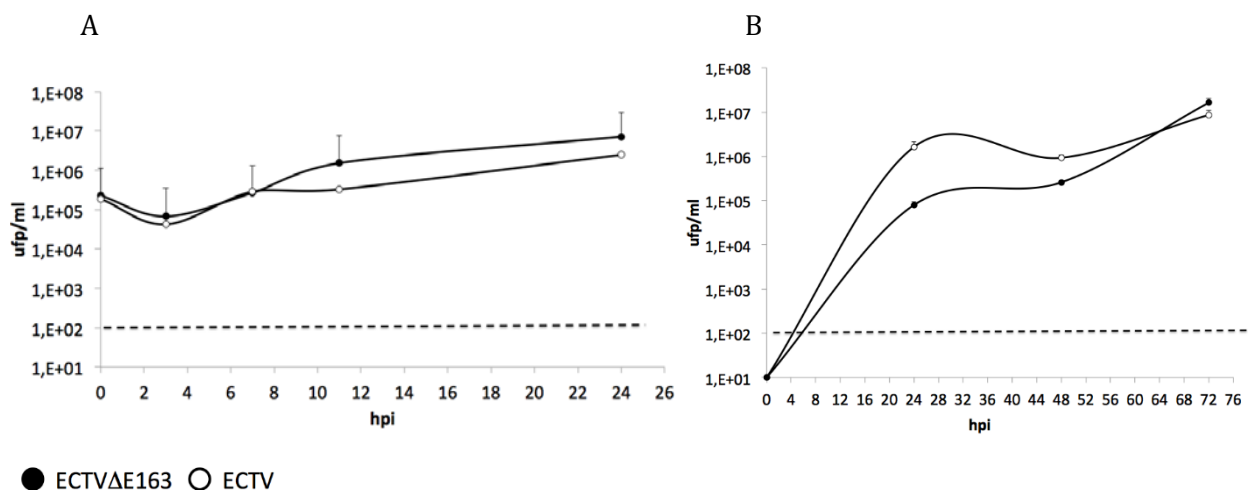


Fig. 34. Cinética de crecimiento en cultivos celulares de ECTVΔE163 y ECTV. A) Ciclo único de infección en células BS-C-1 a una moi=5 ufp/célula. Se muestran los títulos (ufp/ml) obtenidos a las hpi indicadas. B) Ensayo de replicación viral durante 72 hpi a una moi=0,01 ufp/célula. Se muestran los valores de los títulos virales a las hpi indicadas. Cada punto se tituló por triplicado por lo que mostramos la media de los valores obtenidos y las desviaciones estándar en cada caso. Las líneas horizontales discontinuas en A y B indican el límite de detección de la técnica de plaqueo.

4.3.5 La proteína E163 no afecta a la formación de las placas de lisis en ECTV

Con la finalidad de saber si la proteína E163 podría estar implicada en la formación de las placas de lisis en ECTV, infectamos una monocapa de células BS-C-1 con ECTV Δ E163 y ECTV a una moi baja (0,04 ufp/célula). Se observó el tamaño y morfología de las placas de lisis a 6 dpi en un microscopio de contraste de fase (Fig. 35). No observamos diferencias en la formación ni en la morfología de las placas de lisis. En ambos casos, se apreció la morfología característica en forma de racimo de las placas de lisis generadas por ECTV. La proteína E163 no está implicada en este proceso.

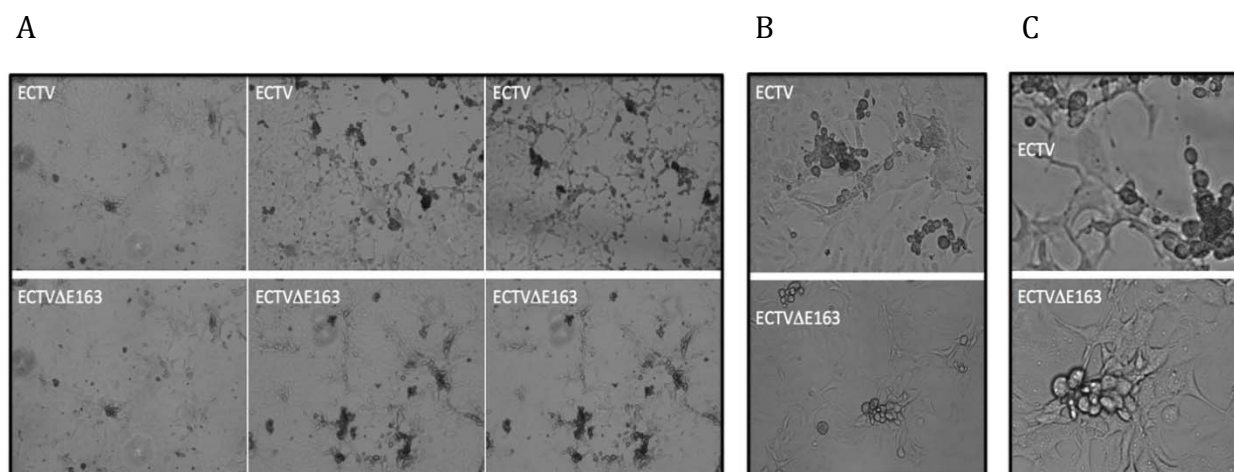


Fig. 35. Morfología de las placas de lisis de ECTV Δ E163 y ECTV a 6 dpi. Infección realizada en una monocapa de células BS-C-1. Fotografías tomadas con un microscopio de contraste de fase con una cámara Leica DM IL LED (Leica Microsistemas) a diferentes aumentos: 4x en A), 10x en B) y 20x en C).

4.3.6 Experimentos *in vivo*

4.3.6.1 Los ratones BALB/c infectados con ECTV Δ E163 tienen un tiempo medio de muerte (TMM) menor a los infectados con el virus parental

Para conocer la posible implicación de la proteína E163 en la patogénesis de *mousepox*, se llevaron a cabo varios experimentos *in vivo* con ratones. Realizamos una primera aproximación para conocer la DL_{50} de ECTV Δ E163, con hembras BALB/c infectadas por vía FP. Infectamos con 4 dosis diferentes (10 , 10^2 , 10^3 y 10^4 ufp/animal) en el caso de ECTV Δ E163 y con 2 dosis (1 y 10 ufp/ratón) en el caso de ECTV. Durante 21 dpi se monitorizaron los síntomas de enfermedad, el peso, la inflamación de la pata inoculada y la supervivencia de ambas infecciones. A partir de 8 dpi comenzamos a observar mortalidades y un aumento significativo en los síntomas y en la pérdida de peso en los animales, que en algunos casos fueron sacrificados por superar los límites de severidad establecidos en este modelo (Fig. 36A, B y C). También se empezó a observar inflamación de la pata inoculada (Fig. 36D).

En ratones inoculados con la menor dosis de ECTV (1 ufp), la primera muerte sucedió a 10 dpi (Fig. 36A), los síntomas de la enfermedad comenzaron a observarse a partir de 8 dpi alcanzando su máximo valor (3,5) a 14 dpi. Las pérdidas de peso se empezaron a observar también a 10 dpi. La DL_{50} de ECTV fue menor a 1

ufp/animal. En la dosis de infección de 10 ufp/animal (Fig. 36B), los animales infectados con el virus recombinante murieron antes en el tiempo comparadas con el virus parental, siendo el TMM de 10,4 d para ECTVΔE163 y de 12,6 días para ECTV. En la pérdida de peso y los síntomas, no observamos grandes diferencias entre las 2 infecciones. La DL_{50} de ECTVΔE163 fue menor a 10 ufp. Comparando las dosis de infección de 10^2 , 10^3 y 10^4 ufp de ECTVΔE163 no observamos un efecto dosis claro entre ellas (Fig. 36C). En la infección con 1 ufp con ECTV, no se observó inflamación de la pata (Fig. 36D), con 10 ufp se detectó una inflamación leve pero no hubo diferencias entre ambos virus y en las dosis superiores de infección con ECTVΔE163, la inflamación de la pata llegó hasta 3,5-4 mm de grosor.

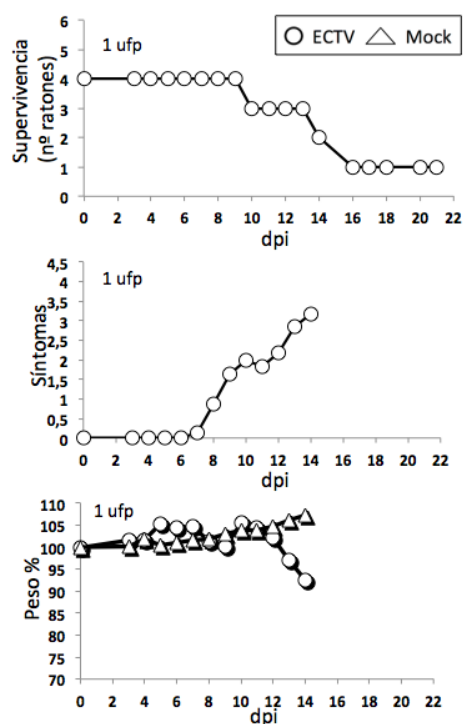
4.3.6.2 En la dosis de infección de 1 ufp, ECTVΔE163 es más virulento que ECTV en ratones BALB/c

Hemos realizado un segundo experimento *in vivo* donde queríamos averiguar la DL_{50} de ECTVΔE163 y comparar la virulencia en la patogénesis de *mousepox* frente al virus parental empleando la cepa de ratones susceptibles, BALB/c y una cepa de ratones más resistentes, B6, que tienen una respuesta celular NK y de LTc más potente. Hembras BALB/c se infectaron del mismo modo que hemos explicado en nuestro experimento anterior y en este caso con 4 dosis, 1, 10, 10^2 y 10^3 ufp/animal. En la infección con 1 ufp/animal (Fig. 37A), observamos que el TMM fue menor en la infección con ECTVΔE163 (13 d) comparado con la infección con ECTV (17,25 d). Las muertes comienzan a partir de 11 dpi. Desde 8 dpi, encontramos mayores síntomas y pérdida de peso en los animales infectados con el virus delecionado comparado con el virus parental. El anticipo de las muertes en la infección con ECTVΔE163 va acompañado de mayores síntomas de enfermedad y más pérdida de peso, con lo que podemos afirmar que a ésta dosis el virus mutante es más virulento que ECTV. La DL_{50} en ECTVΔE163 y en ECTV es <1 ufp, en ratones susceptibles. En dosis mayores de infección (10, 10^2 y 10^3 ufp) no encontramos diferencias relevantes entre ambas infecciones. Hemos medido la inflamación de la pata inoculada y no hemos encontrado diferencias significativas entre ellos (Fig. 37B).

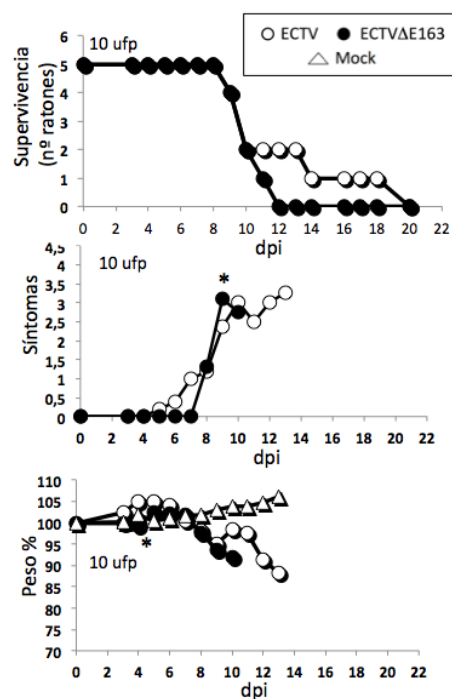
4.3.6.3 Con ratones B6, el TMM es menor en las infecciones con el virus delecionado, en las dosis mayores comparado con el virus parental

Los ratones B6 han sido infectados por vía IN y las dosis empleadas han sido 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 ufp/animal. En la cepa resistente, las muertes, la pérdida de peso y los síntomas comienzan a observarse partir de 8 dpi en 10^3 y 10^4 , a partir de 7 dpi; en 10^5 y en 10^6 , a partir de 6 dpi (Fig. 38). En la dosis de infección de 10^3 ufp, a pesar de haberse dado únicamente una muerte en la infección con ECTV, se observaron pérdidas de peso y síntomas significativamente mayores al virus mutante.

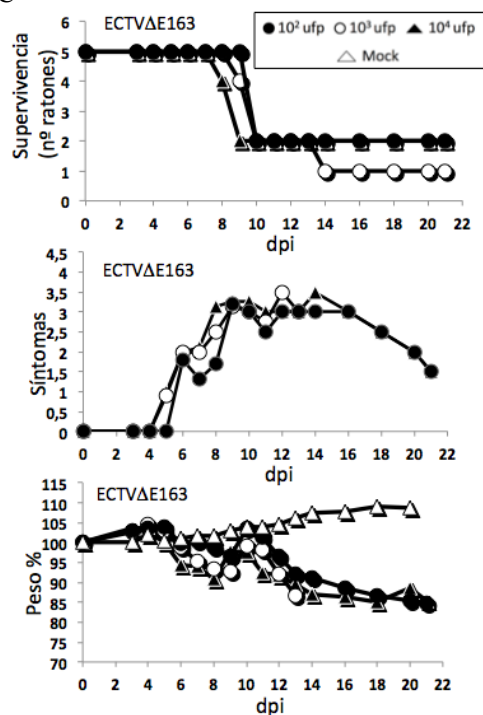
A



B



C



D

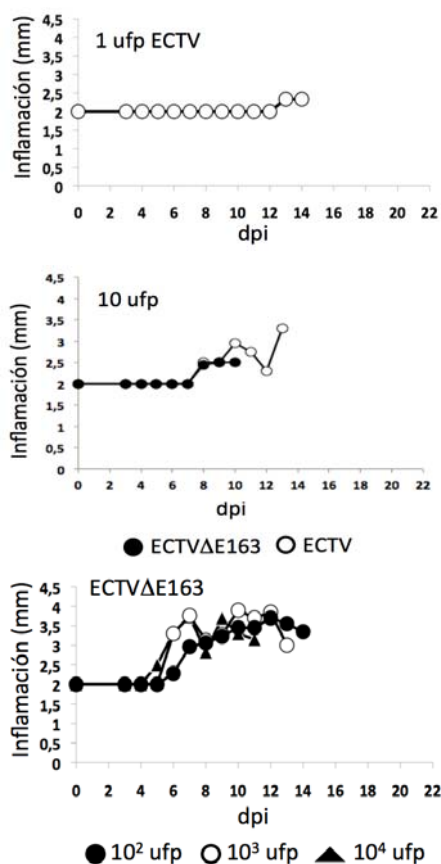


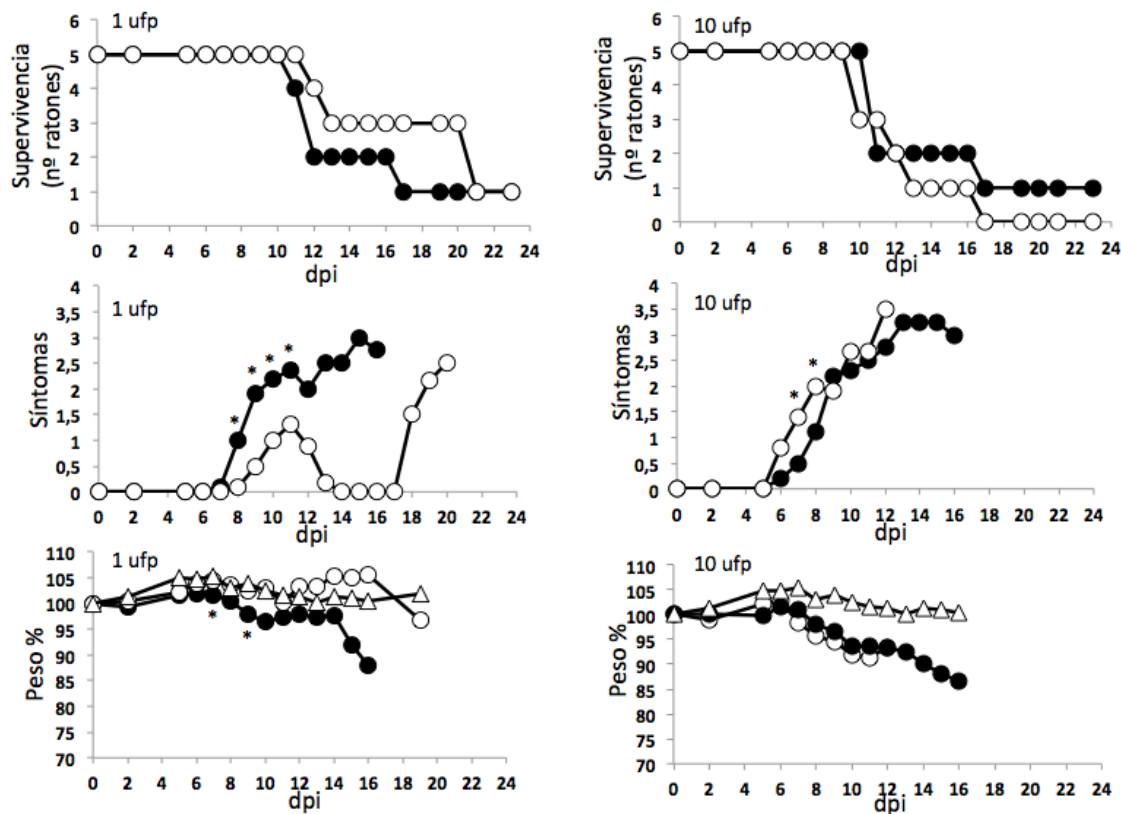
Fig. 36. Supervivencia, síntomas de enfermedad, pérdida de peso e inflamación de la pata inoculada en la infección de ratones BALB/c con ECTVΔE163 y ECTV. Grupos de 5 hembras BALB/c se infectaron a las dosis indicadas con ECTV o ECTVΔE163 a través de la vía FP y se monitorizaron los parámetros indicados durante 21 dpi. Cada punto representa la media y

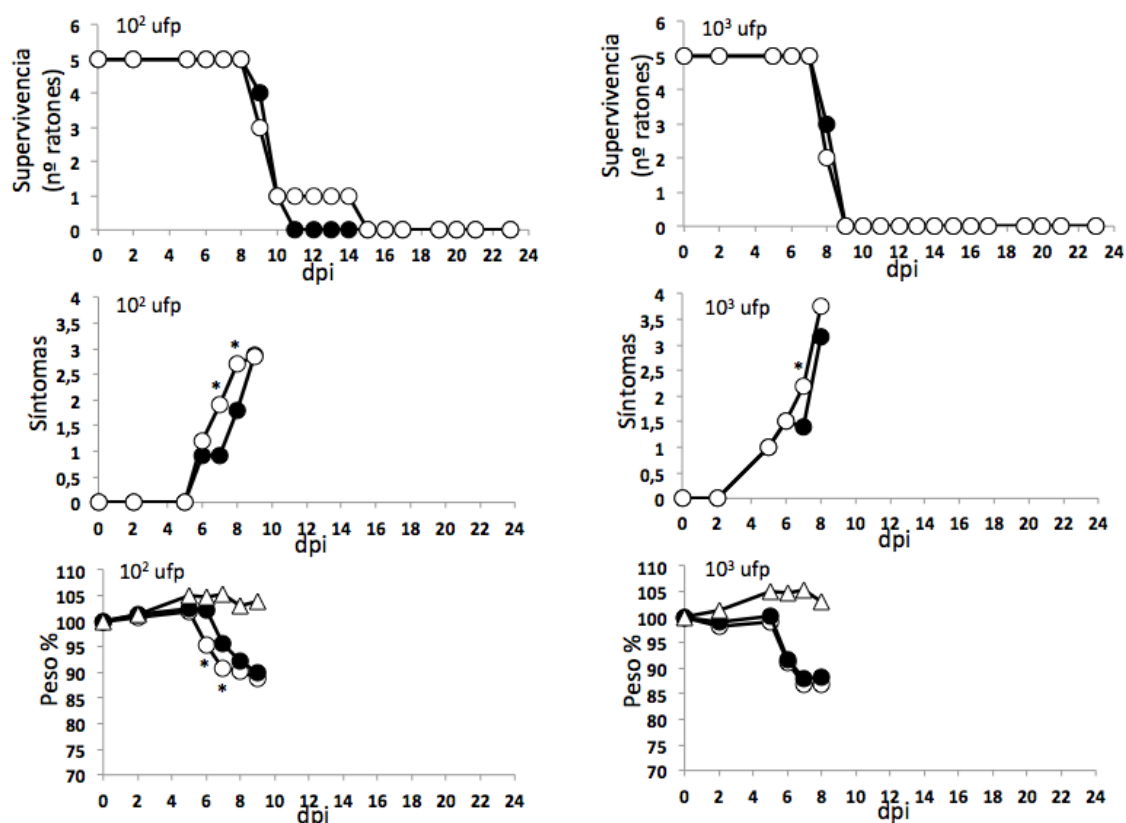
aquellos que tienen una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre infecciones con ECTV Δ E163 frente a ECTV se indican con un asterisco (*). A) La dosis de infección es 1 ufp/animal con ECTV. B) Infecciones con ECTV Δ E163 y ECTV con 10 ufp/animal. C) Infecciones con ECTV Δ E163 con las dosis de 10^2 , 10^3 y 10^4 ufp/animal. D) Inflamación de la pata inoculada (mm) con 1 ufp de ECTV, 10 ufp de ECTV Δ E163 y ECTV; 10^2 , 10^3 y 10^4 ufp de ECTV Δ E163.

En las dosis de infección intermedias, el TMM fue menor en los animales infectados con ECTV Δ E163, 9,25 d (10^4 ufp) y 8,2 d (10^5 ufp) frente a 10,5 d (10^4 ufp) y 10,2 d (10^5 ufp) para ECTV. Si atendemos a la supervivencia, en las dosis intermedias, ECTV Δ E163 fue más virulento que ECTV. Sin embargo, en el resto de parámetros analizados no vimos diferencias significativas entre ambas infecciones. En la dosis de infección de 10^6 ufp, no encontramos diferencias en supervivencia, en síntomas ni en pérdida de peso, entre ambos virus. La DL_{50} estimada para ECTV Δ E163 fue en el rango 10^3 - 10^4 ufp. La DL_{50} estimada para ECTV fue en el rango 10^4 - 10^5 ufp.

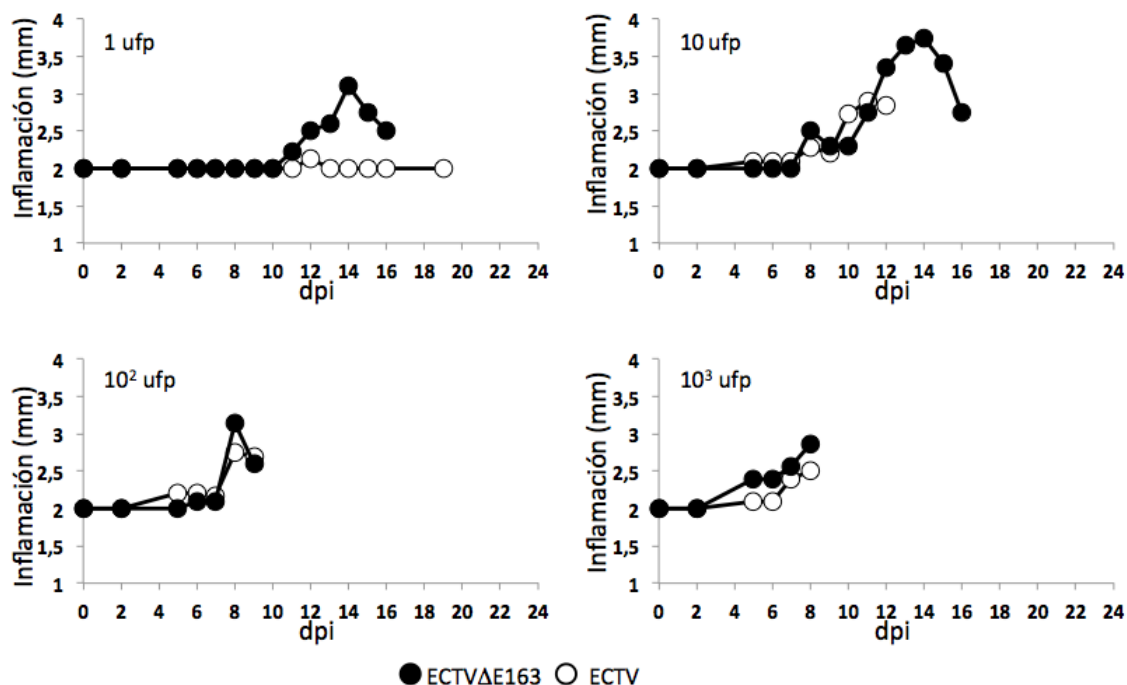
A

● ECTV Δ E163 ○ ECTV △ Mock





B



● ECTVΔE163 ○ ECTV

Fig. 37. Pérdida de peso, síntomas de enfermedad, supervivencia e inflamación de la pata en una infección de ratones con ECTV y ECTVΔE163. Se han monitorizado durante 23 dpi. Grupos de 5 hembras BALB/c se infectaron a las dosis indicadas con ECTV o ECTVΔE163 a través de la vía FP. A) Animales infectados con dosis de 1, 10, 10² y 10³ ufp/animal. B) Se muestra la medida de la inflamación de la pata (mm) inoculada, durante 23 dpi con ECTV y ECTVΔE163 a las diferentes dosis empleadas en este experimento. Los puntos con diferencias significativas ($p < 0,05$) están indicados con un asterisco (*).

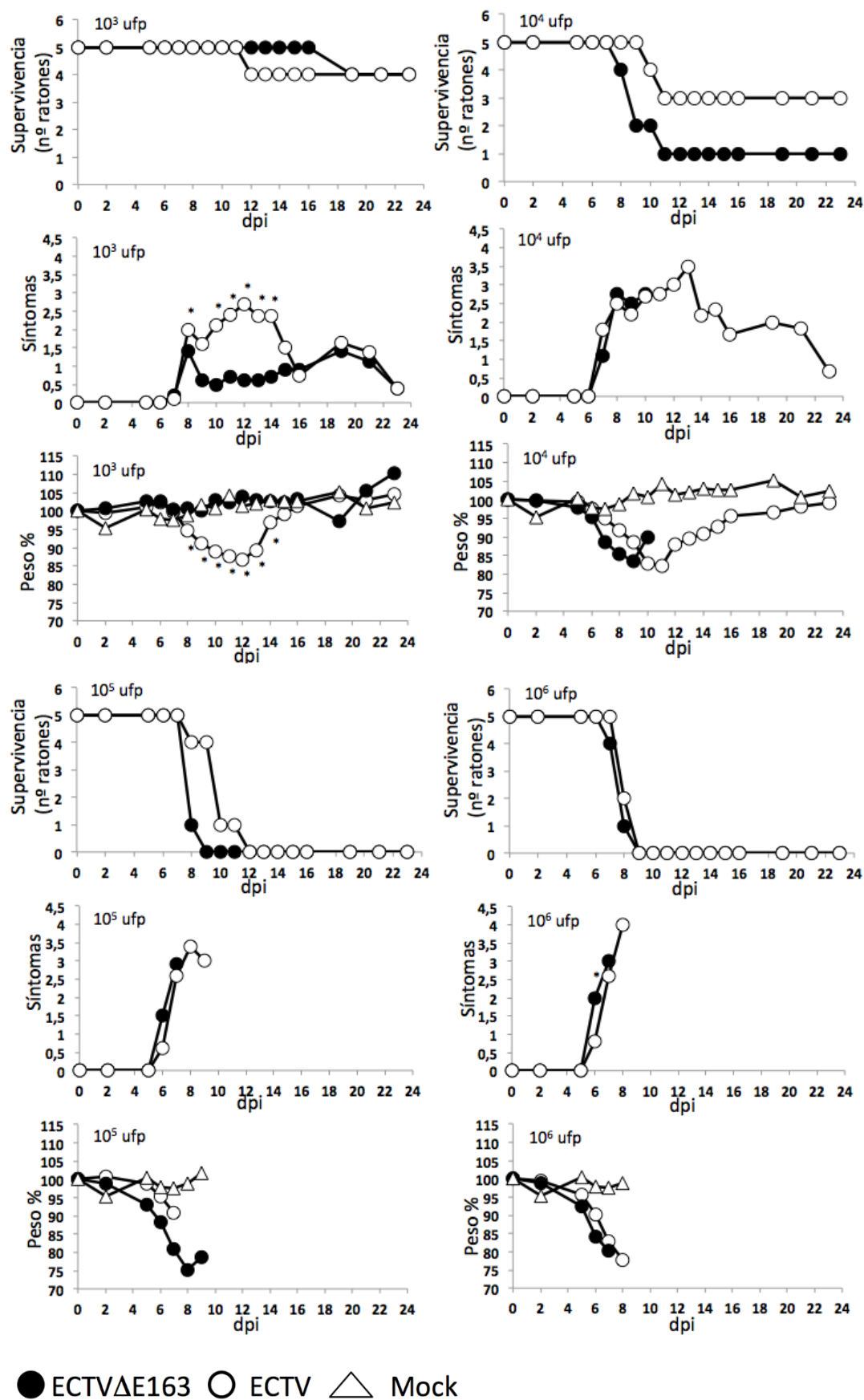


Fig. 38. Síntomas de enfermedad, pérdida de peso y supervivencia de ratones B6 en infecciones con ECTV y ECTVΔE163. Se monitorizan durante 24 dpi. Grupos de 5 hembras B6 se infectaron por vía IN a las dosis indicadas con ECTV o ECTVΔE163. Los puntos dónde hemos encontrado diferencias significativas ($p < 0,05$) se indican mediante asteriscos (*).

4.3.6.4 Análisis de la respuesta inmune celular en animales infectados

4.3.6.5 Análisis de LTc y células NK en ratones infectadas con ECTV Δ E163 y ECTV

Con el objetivo de ver cómo podría estar afectando a la infiltración y activación de leucocitos la falta de expresión de E163 en una infección con ECTV, infectamos por vía FP 6 hembras BALB/c con ECTV Δ E163 y ECTV, con una dosis de 10^2 ufp/animal. Se sacrificaron 3 animales a 2 dpi y 3 a 6 dpi, se extrajeron 3 tipos de ganglios linfáticos (axilares, inguinales y poplíteos) haciendo un pool con cada tipo. Realizamos tinciones para detectar LTc (CD3+ CD8+) y células NK (DX5+) así como su activación (GzB+). Esta fue una primera aproximación, por lo que no sabemos si son diferencias significativas al no haber réplicas en este experimento.

A 2 dpi, encontramos mayor infiltración de LTc en los ganglios poplíteos y axilares de animales infectados con ECTV Δ E163 frente a ECTV (Fig. 39A), también estaban más activadas en el ganglio poplíteo. Sin embargo, encontramos más activación de LTc en ganglios axilares en la infección con ECTV (CD8+ GzB+). No encontramos diferencias en la infiltración de LTc a 6 dpi en ninguno de los ganglios examinados, pero sí observamos una mayor activación en LTc en la infección con ECTV en ganglios axilares, inguinales y bazo. En bazo, también detectamos una mayor infiltración de LT CD8+ en la infección con el virus parental.

En el análisis de células NK (DX5+), observamos una mayor infiltración en ganglio poplíteo a 2 dpi en la infección con ECTV Δ E163 (Fig. 39D), comparada con el virus parental. Sin embargo, estas células, estaban más activadas en la infección con ECTV. A 6 dpi (Fig. 39E y F) detectamos una mayor infiltración de células NK en ganglios inguinales y en bazo en animales infectados con ECTV. Las células NK estaban más activadas en el ganglio inguinal con ECTV comparado con ECTV Δ E163 (Fig. 39E) y más activadas en bazo en la infección con ECTV Δ E163 (Fig. 39F).

A 2 dpi parece que había una mayor infiltración de LTc (Fig. 39A y B) en ganglios poplíteos y axilares y que estaban más activadas en el ganglio poplíteo en la infección con ECTV Δ E163 comparada con ECTV. Cuando analizamos a 6 dpi (Fig. 39B y C) parece que había mayor porcentaje de LTc en el bazo y que éstos estaban más activados en ganglios axilares e inguinales en la infección con ECTV comparada con ECTV Δ E163. Al analizar las células NK encontramos que a 2 dpi (Fig. 39D) parece que había un mayor porcentaje de células NK en ganglios poplíteos y mayor activación de éstos, en los ganglios inguinales en la infección con el virus deletado comparada con el parental. A 6 dpi (Fig. 39E y F), observamos un mayor porcentaje de células NK en ganglios inguinales y bazo; también estaban más activados en ganglios axilares e inguinales en animales infectados con ECTV frente a los infectados con ECTV Δ E163.

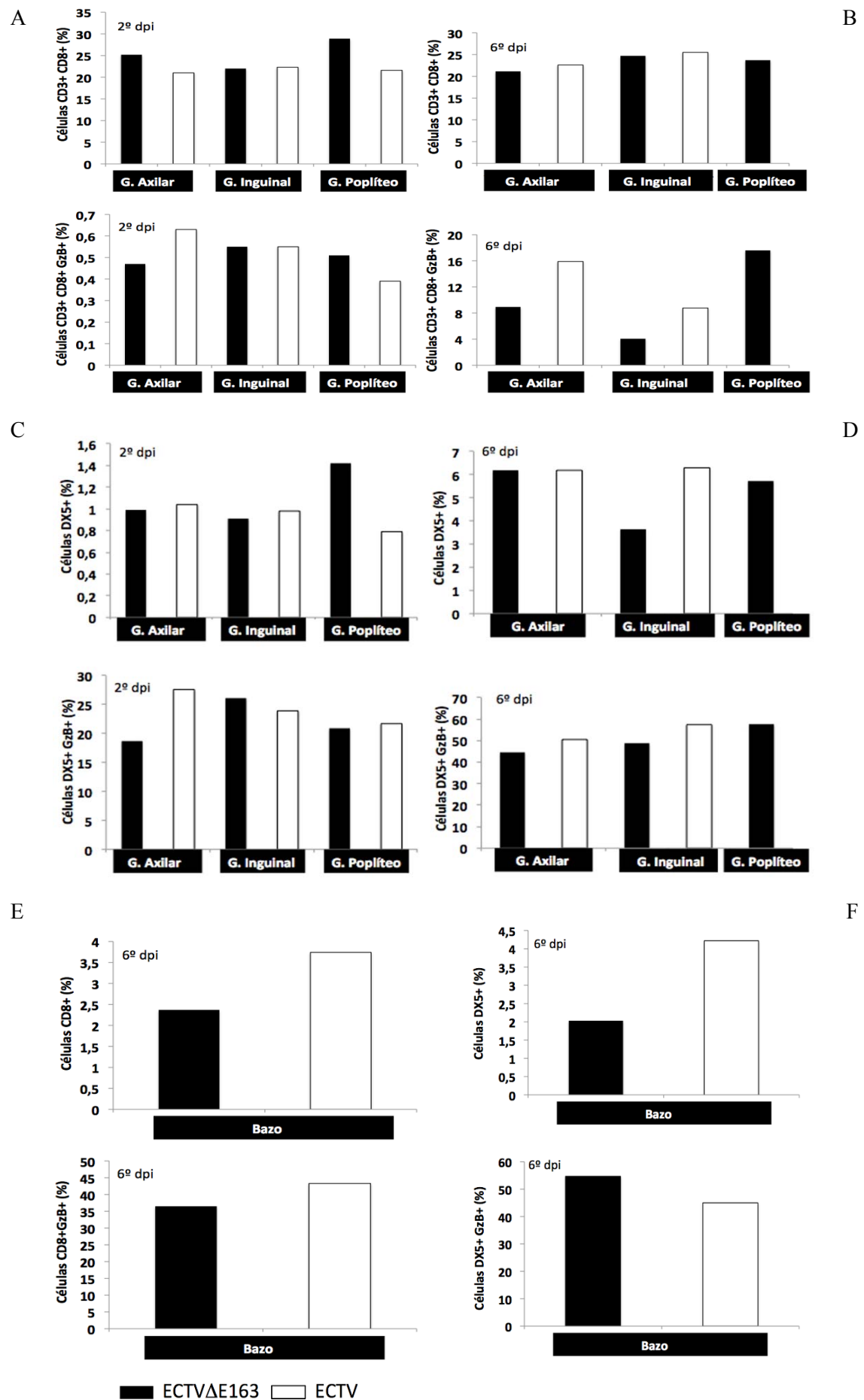


Fig. 39. Análisis celular por citometría de flujo en ratones infectados con ECTVΔE163 y ECTV. Los órganos linfáticos se

analizaron a 2 y 6 dpi. Porcentaje de LTc (CD3+ CD8+), activados (CD3+CD8+GzB+) (A, B y C), células NK (DX5+) y NK activadas (DX5+ GzB+) (D, E y F), en hembras BALB/c infectadas con ECTVΔE163 o ECTV. Se han extraído ganglios poplíteos, axilares e inguinales y el bazo a 2 y a 6 dpi para ser procesados y marcados para su posterior análisis por citometría de flujo. Los Ab empleados fueron : anti-CD3-PerCP, anti-CD8-APC, anti-DX5-FITC y anti-GzB-PE.

4.3.6.5.1 Análisis de la respuesta memoria de LT CD8+ en una infección con ECTVΔE163 frente a ECTV

Si la hipótesis del aumento de leucocitos a nivel local en una infección con ECTVΔE163 frente a una infección con ECTV era cierta, nos llevaría a pensar que la respuesta memoria se vería reforzada también. Para comprobar si sucedía así, utilizamos animales B6 que habían sobrevivido a nuestro anterior experimento *in vivo* en una infección con ECTVΔE163 (5 animales) y con ECTV (7 animales) para volver a infectarlos a los 3 meses post-infección con una dosis letal de ECTV (10^5 ufp/animal) por la vía IN. Además, añadimos un grupo de animales (n=5) que infectaríamos por primera vez para usarlos de control. A 4 dpi fueron sacrificados, extrajimos el bazo para procesarlo y realizar una activación *ex vivo* con péptidos inmunogénicos de VACV (B8R, B2R y A6L) y realizar una tinción específica para LTc activados (CD3+ CD8+ INF γ) para analizarlo por citometría de flujo. También titulamos bazo, hígado y pulmón.

Tras la activación con el péptido inmunodominante de la proteína B8 de VACV, observamos un aumento en el porcentaje de activación de los LTc (CD3+ CD8+ INF γ +) (Fig. 40A), en el caso de los animales re infectados (ECTV 2 y ECTVΔE163 2), comparados con los animales infectados por primera vez (Infección 1). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los animales procedentes de una infección con ECTV o con ECTVΔE163. Tampoco observamos ningún efecto de activación con el resto de péptidos utilizados (Fig. 40B y C). El porcentaje de LT CD8+ (Fig. 40A, B, C y D) fue igual en todos los grupos comparados (ECTV 2, ECTVΔE163 2, infección 1 y mock) y con todos los péptidos inmunogénicos empleados.

Como parte de este experimento, extrajimos bazo, hígado y pulmón (4 dpi) y titulamos los órganos de todos los grupos del experimento: infección 1, ECTV 2 y ECTVΔE163 2. No pudimos detectar título viral (ufp/g) en ninguno de los animales re-infectados (ECTV2 y ECTVΔE163 2) (Fig. 41B). En los animales infectados por primera vez con ECTV (infección 1), observamos títulos mayores en bazo, seguido del hígado y por último en pulmón (Fig. 41A).

4.3.6.6 ECTVΔE163 es más virulento que el virus parental en la dosis de 0,1 ufp/animal, con ratones BALB/c

Hemos realizado un último experimento *in vivo*, aumentando el número de individuos por dosis de infección (n=10) para obtener datos más significativos sobre la patogénesis de *mousepox*. Infectamos ratonas BALB/c (FP) (Fig. 42) y B6 (IN) (Fig. 43).

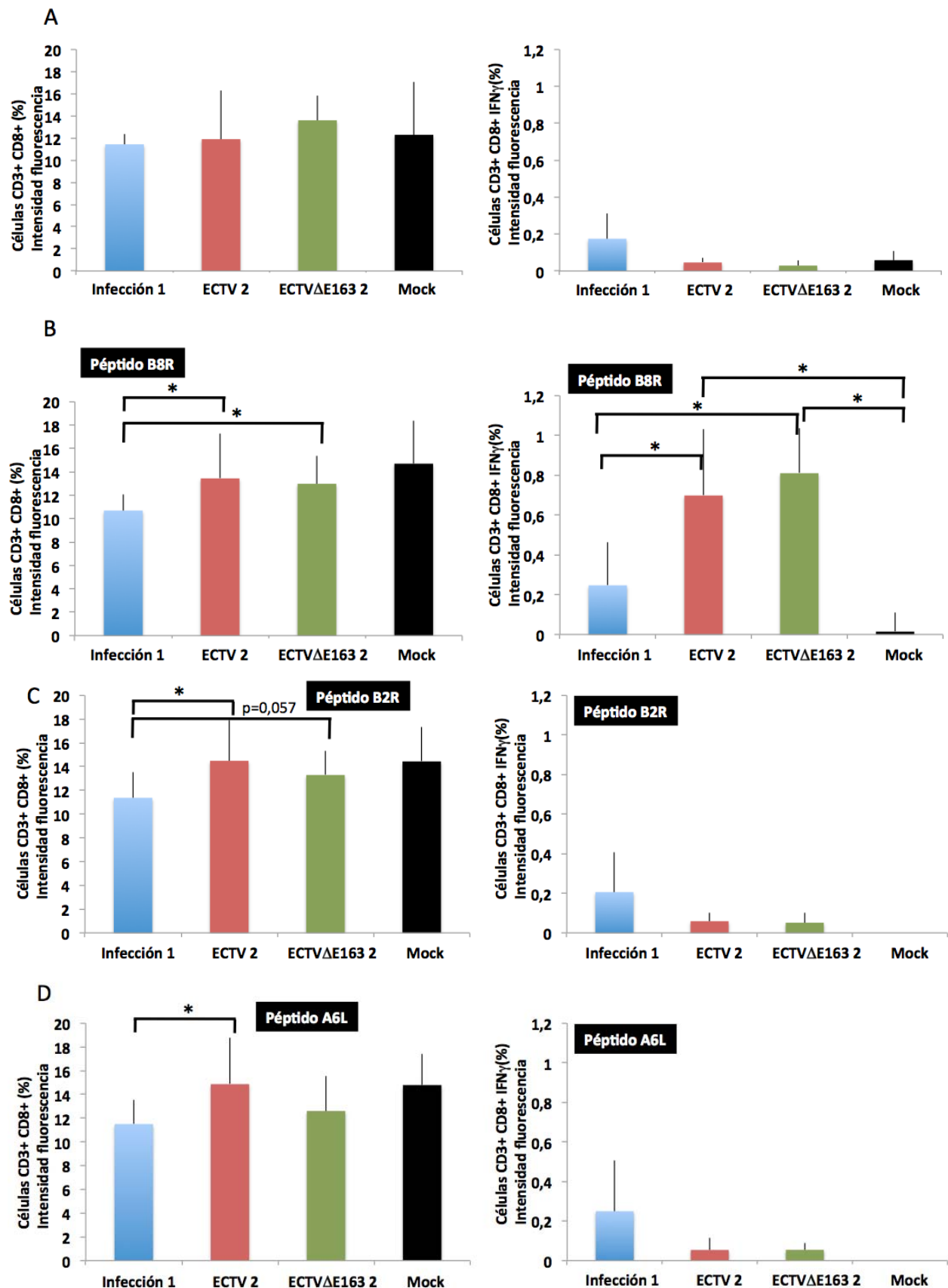


Fig. 40. Porcentaje de LTc (CD3+ CD8+) y LTc activados (IFN γ +) tras reinfección de ratones con ECTV y analizado por citometría de flujo. Los anticuerpos empleados fueron: anti-CD3-PerCP, anti-CD8-PE y anti-IFN γ -APC. Los esplenocitos han sido activados con los péptidos inmunogénicos B8R (B), B2R (C) y A6L (D) de VACV. Se ha realizado un marcaje celular en ausencia de activación *ex vivo* como control (A). Los grupos analizados son, infección 1: animales infectados por primera vez con ECTV (n=5); ECTV 2: animales infectados con ECTV y a los 3 meses pi fueron re-infectados con ECTV (n=7); ECTV Δ E163 2: animales infectados con ECTV Δ E163 y re-infectados con ECTV (n=5) a los 3 meses

postinfección; mock: animales no infectados (n=3). En todos los casos se extrajo el bazo de las hembras C57BL/6. Se muestra la media de la intensidad de la fluorescencia (%) en cada caso. Se indica con un asterisco (*) los casos con una diferencia significativa ($p < 0,05$).

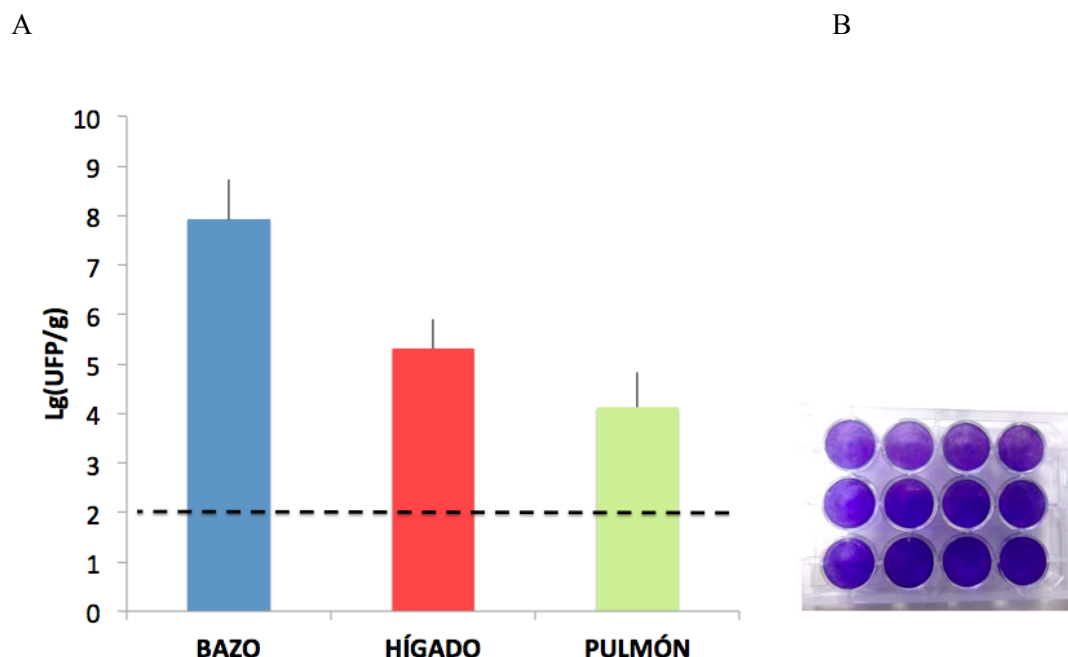


Fig. 41. Título viral obtenido tras la infección con ECTV. Se extrajo bazo, hígado y pulmón de hembras B6 infectadas previamente con ECTV y con ECTVΔE163, o ratones infectados por primera vez con ECTV. A) Título viral obtenido (ufp/g). Se muestra la media de los animales utilizados en el experimento. Las barras indican la desviación estándar en cada caso. La línea horizontal indica el límite de detección de la técnica de plaqueo. B) Titulación llevada a cabo con animales previamente infectados con ECTV. Se muestra una placa M6 como ejemplo al no poder contabilizar pfus.

Para los animales susceptibles, infectamos con las siguientes dosis: 0,1, 1 y 10 ufp/animal, y con la cepa de ratones resistentes, las dosis de infección fueron: 10^3 , 10^4 y 10^5 ufp/animal. Monitorizamos los síntomas de enfermedad, supervivencia y pérdida de peso durante 23 dpi en ambos casos.

En las infecciones en BALB/c (Fig. 42), observamos que con la dosis de infección de 0,1 ufp, los animales empezaron a morir a partir de 12-13 dpi. ECTVΔE163 fue más virulento que ECTV, ya que el TMM fue de 17,7 dpi para ECTVΔE163 frente a 20,2 dpi en ECTV. Encontramos además síntomas de enfermedad mayores entre 15 a 17 dpi en la infección con el virus mutante frente al parental. En la siguiente dosis de infección (1 ufp/ratón), sin embargo, el TMM de ECTVΔE163 fue mayor (14,2 d) que con ECTV (12,2 d) pero hay mayores síntomas de enfermedad entre los 12 a 14 dpi en ECTVΔE163, comparado con el virus parental. Las diferencias encontradas en la pérdida de peso no fueron significativas entre ambas infecciones. Con 10 ufp/ratón, el TMM fue menor en ECTV (7,8 d) frente a ECTVΔE163 (9,1 d). En días no consecutivos (4, 6 y 10 dpi), encontramos mayores síntomas de enfermedad también en el virus parental. En resumen, en ratones susceptibles BALB/c, ECTVΔE163 se comportó como un virus más virulento que ECTV en dosis bajas (0,1 ufp/animal) ya que el TMM fue menor y además fue acompañado de mayores síntomas de enfermedad.

Sin embargo, a mayores dosis de infección (1 y 10 ufp/ratón) el TMM fue algo inferior para ECTV aunque no estuvo acompañado del resto de parámetros monitorizados. La DL_{50} para ECTV Δ E163 y ECTV fue $<0,1$ ufp/animal en ratones BALB/c. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que hayan ocurrido re-infecciones entre animales de la misma jaula y que la DL_{50} sea en realidad superior.

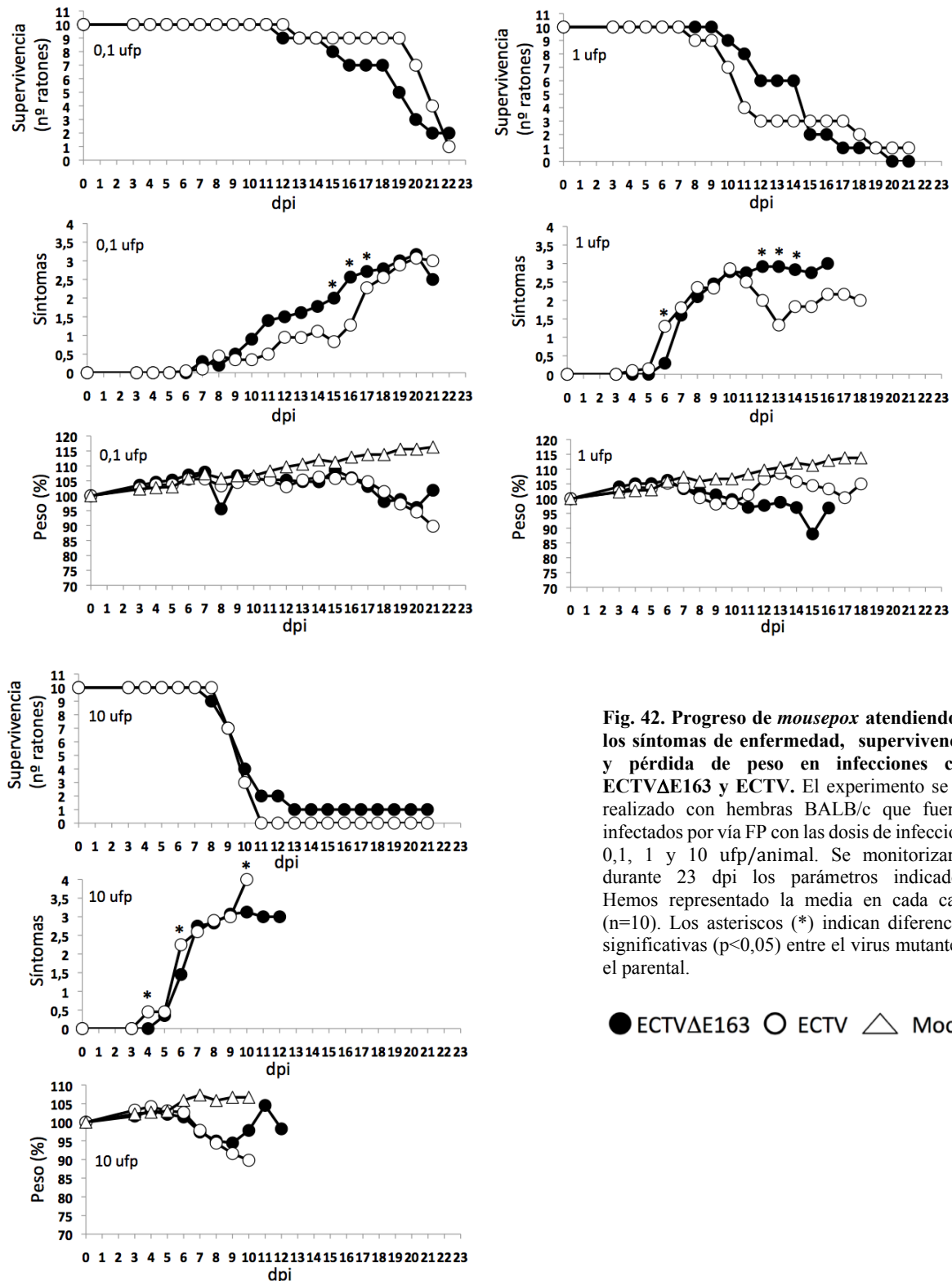


Fig. 42. Progreso de mousepox atendiendo a los síntomas de enfermedad, supervivencia y pérdida de peso en infecciones con ECTV Δ E163 y ECTV. El experimento se ha realizado con hembras BALB/c que fueron infectados por vía FP con las dosis de infección: 0,1, 1 y 10 ufp/animal. Se monitorizaron durante 23 dpi los parámetros indicados. Hemos representado la media en cada caso (n=10). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre el virus mutante y el parental.

| C57BL/6 | 10 ³ ufp | | 10 ⁴ ufp | | 10 ⁵ ufp | |
|---------|---------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| DPI | ECTVΔE163 | ECTV | ECTVΔE163 | ECTV | ECTVΔE163 | ECTV |
| 0 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 3 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 4 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 5 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 6 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 7 | 10/10 | 10/10 | 9/10 | 10/10 | 9/10 | 10/10 |
| 8 | 10/10 | 10/10 | 9/10 | 9/10 | 5/10 | 9/10 |
| 9 | 10/10 | 10/10 | 9/10 | 8/10 | 4/10 | 7/10 |
| 10 | 10/10 | 10/10 | 7/10 | 5/10 | 4/10 | 3/10 |
| 11 | 9/10 | 9/10 | 7/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 12 | 8/10 | 8/10 | 7/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 13 | 8/10 | 8/10 | 7/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 14 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 15 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 16 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 17 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 18 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 19 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 20 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 21 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |

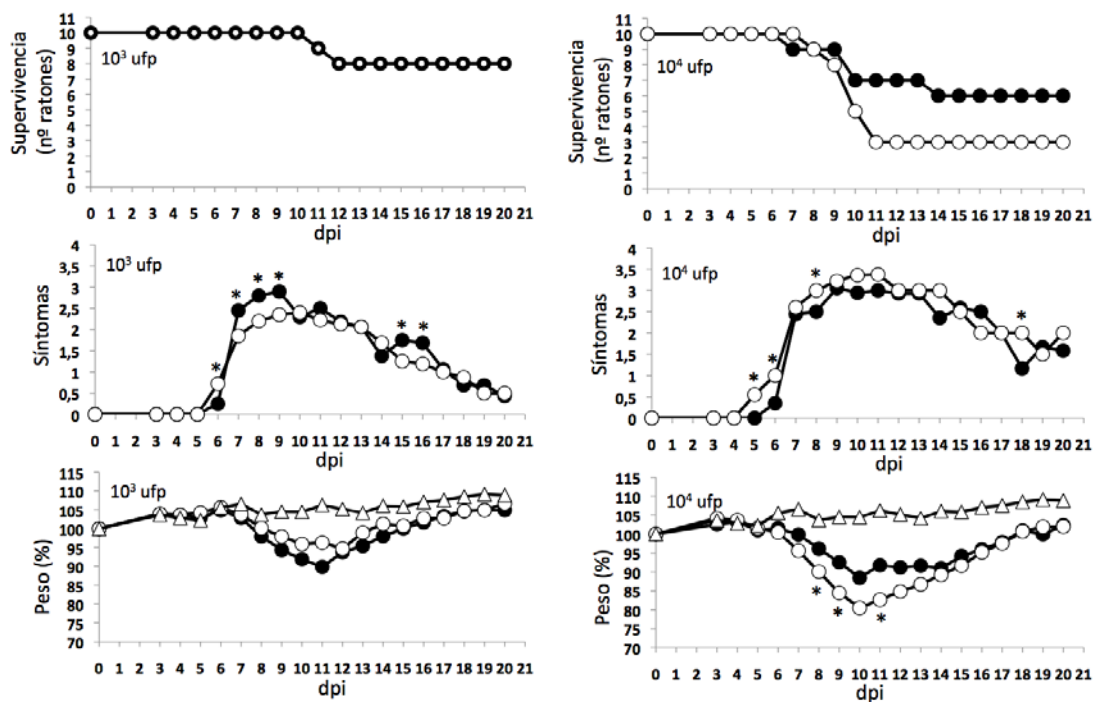
Tabla 9. Supervivencia en infecciones con ECTV y ECTVΔE163. Datos de supervivencia durante 22 dpi de las dosis de infección empleadas en el experimento.

| ECTVΔE163 | Síntomas de enfermedad en dosis 0,1 ufp | | | | | | | | | |
|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Ratón número | | | | | | | | | |
| DPI | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0,5 |
| 8 | 0 | 0 | 0,5 | 1 | 0,5 | 0 | 0 | 0,5 | 1 | 1 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 1 | 0 | 0,5 | 0 | 1 | 0,5 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 3 | 0 | 2,5 | 1 | 1 | 1,5 |
| 13 | 0 | 0 | 1 | 1 | | 1 | 2,5 | 1 | 1 | 1 |
| 14 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | | 1,5 | 3 | 1 | 2 | 2 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 1 | | 0,5 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 1 | 1 | 0 | 0,5 | | 0,5 | 3 | 2 | 2 | 1,5 |
| 17 | 2,5 | 2,5 | 2 | 2,5 | | 2 | 2,5 | 2 | 2 | 2,5 |
| 18 | 2,5 | 3 | 2,5 | 3 | | 2 | 3 | 2,5 | 2,5 | 2 |
| 19 | 3 | 3 | 2,5 | 3 | | 3 | 3 | 3 | 2,5 | 3 |
| 20 | | | 3 | 3 | | 3 | 3,5 | 3 | 3 | 3 |
| 21 | | | | | | 3 | | 3 | | |

Tabla 10. Síntomas de enfermedad en ratones infectados con ECTVΔE163. Se muestran los datos de la dosis de infección de 0,1 ufp/animal durante 21 dpi como ejemplo de los síntomas de enfermedad de los animales de modo individualizado.

4.3.6.7 ECTVΔE163 es más virulento que el virus parental en las dosis de 10^5 ufp con ratones B6

En los ratones B6 (Fig. 43) en la menor de las dosis de infección (10^3 ufp/ratón), no vimos diferencias en supervivencia ni en pérdida de peso entre ambos virus. Sin embargo, entre los días 7 a 9 y 15 a 16 detectamos mayores síntomas de enfermedad con ECTVΔE163. Con la dosis de infección de 10^4 ufp/animal, la infección con ECTV parece ser más virulenta. Detectamos un mayor número de muertes totales, el TMM es algo menor (9,9 d) comparado con ECTVΔE163 (10,8 d) y también observamos una mayor pérdida de peso en los días 8, 9 y 11 pi. Los síntomas de enfermedad fueron mayores en 3 días puntuales (5, 6 y 8 dpi) en la infección con el virus parental también. Con la infección de 10^5 ufp/animal, observamos que el virus mutante tiene un TMM menor (8,4 d) que los animales infectados con ECTV (9,4 d). Además, los síntomas de enfermedad fueron significativamente mayores en ECTVΔE163 en los 5, 7 y 17 dpi. Sin embargo, la pérdida de peso fue mayor con ECTV a 4 y 9 dpi, d no consecutivos. En la mayor de las dosis de infección (10^5 ufp/ratón) parece que la infección con ECTVΔE163 fue más virulenta que con ECTV, pero en la dosis intermedia, 10^4 ufp/animal, observamos lo contrario. Por lo tanto, la virulencia que observamos parece dependiente de la dosis de infección utilizada.



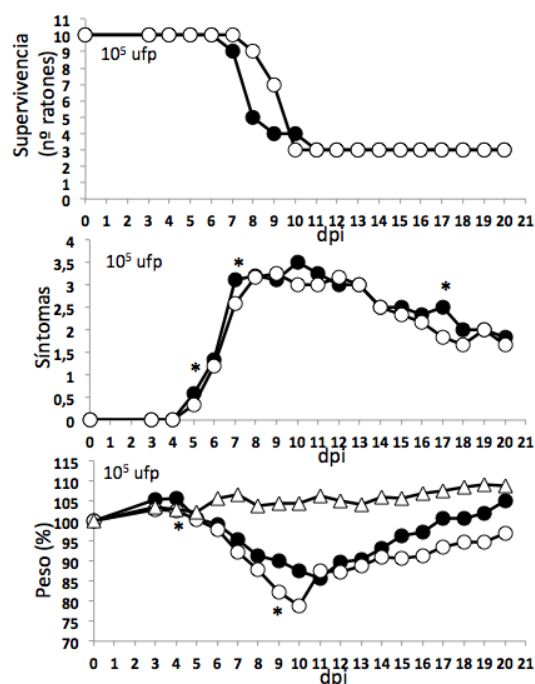


Fig. 43. Progreso de mousepox atendiendo a los síntomas de enfermedad, supervivencia y pérdida de peso en infecciones con ECTVΔE163 y ECTV en B6. Grupos de 10 hembras B6 por dosis de infección (10^3 , 10^4 y 10^5 ufp/animal) fueron infectadas IN. Se han monitorizado los parámetros indicados durante 21 dpi. Cada punto representa la media de cada día. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el virus mutante y el parental.

● ECTVΔE163 ○ ECTV △ Mock

| C57BL/6 | 10^3 ufp | | 10^4 ufp | | 10^5 ufp | |
|---------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|
| DPI | ECTVΔE163 | ECTV | ECTVΔE163 | ECTV | ECTVΔE163 | ECTV |
| 0 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 3 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 4 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 5 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 6 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| 7 | 10/10 | 10/10 | 9/10 | 10/10 | 9/10 | 10/10 |
| 8 | 10/10 | 10/10 | 9/10 | 9/10 | 5/10 | 9/10 |
| 9 | 10/10 | 10/10 | 9/10 | 8/10 | 4/10 | 7/10 |
| 10 | 10/10 | 10/10 | 7/10 | 5/10 | 4/10 | 3/10 |
| 11 | 9/10 | 9/10 | 7/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 12 | 8/10 | 8/10 | 7/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 13 | 8/10 | 8/10 | 7/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 14 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 15 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 16 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 17 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 18 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 19 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 20 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |
| 21 | 8/10 | 8/10 | 6/10 | 3/10 | 3/10 | 3/10 |

Tabla 11. Supervivencia tras infecciones con ECTVΔE163 y ECTV. Datos recogidos durante 21 dpi de las dosis de infección de 10^3 - 10^5 ufp/animal en hembras B6.

4.3.6.8 Ensayo de transmisión *in vivo* con ratones infectados con ECTVΔE163 y ECTV

El objetivo de este experimento era averiguar si ECTVΔE163 se transmite entre la población de igual modo que el virus parental. Para ello infectamos 6 hembras BALB/c por vía FP con una dosis de 10^3 ufp/animal.

A 2 dpi, 2 animales se pusieron en contacto con 4 animales sanos (G1), la ventana de exposición fue de 2-5 dpi, los 4 animales sanos se aislaron y se les monitorizaron los síntomas, la pérdida de peso y la supervivencia durante 24 d post-exposición (dpe). Se crearon 2 grupos de exposición más en el experimento, G2 estuvo en contacto con 2 ratones enfermos con una ventana de exposición de 4-7 dpi y G3 tuvo una ventana de exposición de 6-9 dpi (Fig. 44).

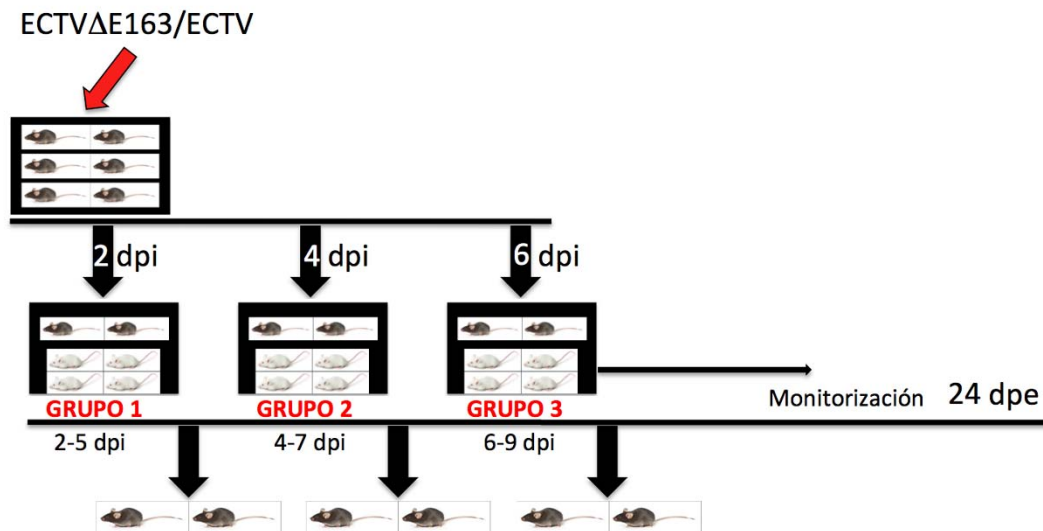


Fig. 44. Esquema del diseño experimental. Se infectan 6 hembras BALB/c. A diferentes dpi, se ponen en contacto 2 ratones enfermos con 4 sanas creando 3 grupos. Las ventanas de exposición fueron: 2-5 dpi (G1), 4-7 dpi (G2) y 6-9 dpi (G3). Los ratones expuestos se monitorizan durante 24 dpe teniendo en cuenta la supervivencia, los síntomas y la pérdida de peso.

La enfermedad se transmitió de un animal a otro de igual modo en el caso de ECTVΔE163 y ECTV, por lo que podemos decir que E163 no afecta a la transmisión de la enfermedad entre individuos. Lo que encontramos nuevamente en los grupos de exposición G2 y G3 (Fig. 45), es que los animales infectados con ECTVΔE163 (TMM= 16,5 d en G2 y 12 d en G3) tuvieron una tendencia a morir antes que los infectados con ECTV (TMM= 17 d en G2 y 12,3 d en G3). No encontramos grandes diferencias en la pérdida de peso ni en los síntomas de enfermedad entre las 2 infecciones. Los animales con 2 dpi no fueron capaces de transmitir la enfermedad, con lo que la ventana de exposición de 2 a 4 dpi no es eficiente aún para dicho suceso.

4.3.6.9 Replicación viral en ratones infectados con ECTVΔE163 y ECTV

El título viral en diferentes órganos en una infección con ECTVΔE163 frente a ECTV podría clarificar si existe alguna diferencia en la replicación y dispersión del virus *in vivo* al carecer de la expresión de la proteína E163. Para determinar el título viral a 5 dpi, se infectaron 5 hembras de cada cepa de ratón por virus.

En los animales BALB/c infectamos con una dosis de 10^2 ufp y extrajimos bazo, hígado y pata para analizar. En la cepa B6, la dosis de infección fue de 10^5 ufp y se extrajeron bazo, hígado y pulmón. En los animales susceptibles (Fig. 46A), encontramos mayor título en la pata ($>10^{10}$ ufp/g), seguido del bazo ($\sim 10^{10}$ ufp/g) y por último en hígado ($\sim 10^6$ ufp/g) (Fig. 46A). No encontramos diferencias significativas entre los valores

de los títulos virales entre ambos virus. En B6 (Fig. 46B), encontramos un título viral entre 10^7 - 10^9 ufp/g en bazo, seguido del hígado con un valor entre 10^7 - 10^8 ufp/g y no detectamos replicación viral en el pulmón por encima del límite de detección del ensayo (resultado no mostrado). Tampoco encontramos diferencias significativas entre ambas infecciones.

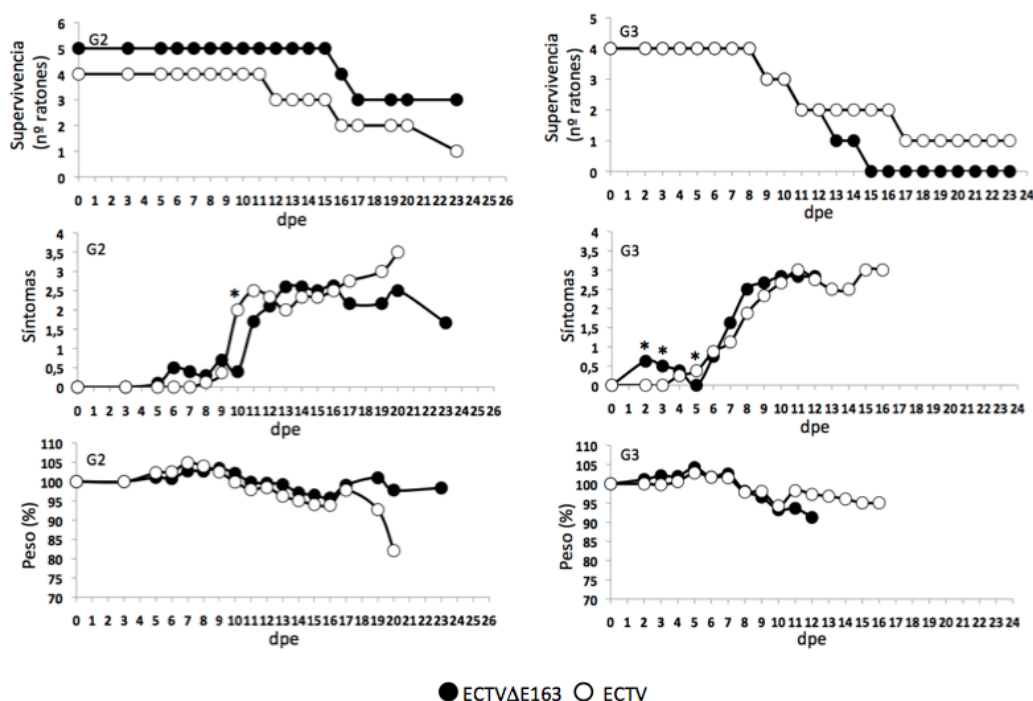


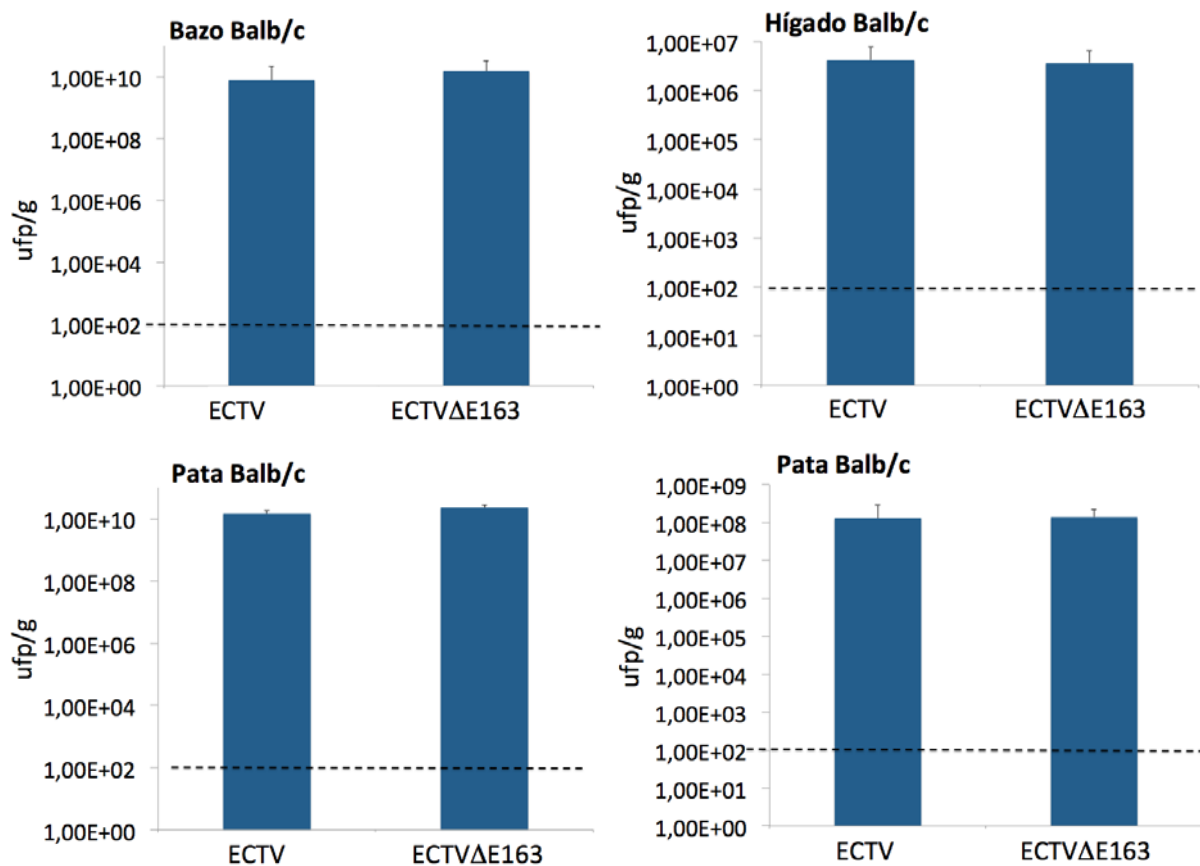
Fig. 45. Síntomas de enfermedad, supervivencia y pérdida de peso en experimento de transmisión de ECTVΔE163 y ECTV. Se infectaron 6 hembras BALB/c por virus, vía FP con una dosis de 10^2 ufp/animal. Se pusieron en contacto 2 ratones infectados con 4 sanos creando 4 grupos de exposición: G1 (2-5 dpi), G2 (4-7 dpi) y G3 (6-9 dpi). A los animales expuestos se les monitorizaron las variables indicadas arriba durante 24 dpe. En G2, el número de ratones sanos que se puso en contacto con animales infectados con ECTVΔE163 fueron 5. Se muestra la media de cada día. En caso de haber diferencias significativas ($p < 0,05$) se ha indicado con un asterisco (*).

Infectamos 12 ratones/virus de ambas cepas nuevamente, para realizar un análisis celular (apartado 6.9) de ambas infecciones y determinar el título viral a 2 dpi. Las dosis de infección, la vía de infección y los órganos extraídos y analizados han sido los mismos descritos que para 5 dpi. A 2 dpi solamente hemos obtenido valores en el caso de la pata de los animales BALB/c (10^8 ufp/g), nuestro límite de detección con la técnica de plaqueo no nos permite hallar los valores en el resto de órganos. Tampoco en este caso encontramos diferencias significativas entre ambos virus (Fig. 46A gráfica 4).

4.3.6.10 Aumento de linfocitos Th2 en ratones infectados con ECTVΔE163 frente a la infección con ECTV

En una infección con ECTV, la ausencia de expresión de E163 podría tener un efecto local en la infiltración celular en los ganglios linfáticos. Para examinarlo, realizamos una infección con ECTVΔE163 y con ECTV. A 2 dpi los animales fueron sacrificados y extrajimos los ganglios linfáticos (ganglios poplíteos en BALB/c y ganglios cervicales superiores en B6).

A



B

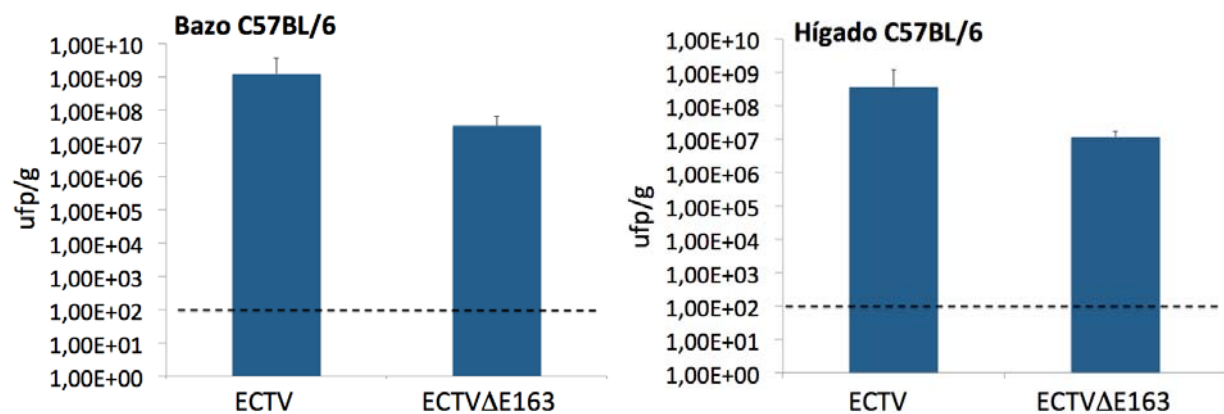


Fig. 46. Título viral en órganos de ratones infectados con ECTVΔE163 o con ECTV. A) Infectamos 5 hembras BALB/c por vía FP con una dosis 10^2 ufp. Los animales fueron sacrificados a 5 dpi y se extrajeron pata inoculada, bazo e hígado para analizar la replicación viral. Gráfica 4: Se infectaron 12 ratones BALB/c y 12 B6 por virus, las infecciones se llevaron a cabo del mismo modo descrito arriba. A 2 dpi se extrajeron pata inoculada, bazo e hígado para analizar el título viral. B) Se infectaron 5 hembras B6 con una dosis de 10^5 ufp por vía IN. Se sacrificaron a 5 dpi extrayendo bazo, hígado y pulmón para analizar el título viral. Se representa la media en cada caso. Las barras indican la desviación estándar. La línea horizontal representa el límite de detección.

Procesamos los órganos para su posterior análisis por citometría de flujo. Hemos realizado marcaje celular para linfocitos Th2 ($CD3^+ CD4^+ IL4^+$), células NK ($DX5^+ GzB^+$), LTc ($CD3^+ CD8^+ GzB^+$) y CDs maduras ($CD11c^+ CD86^+ CD80^+$).

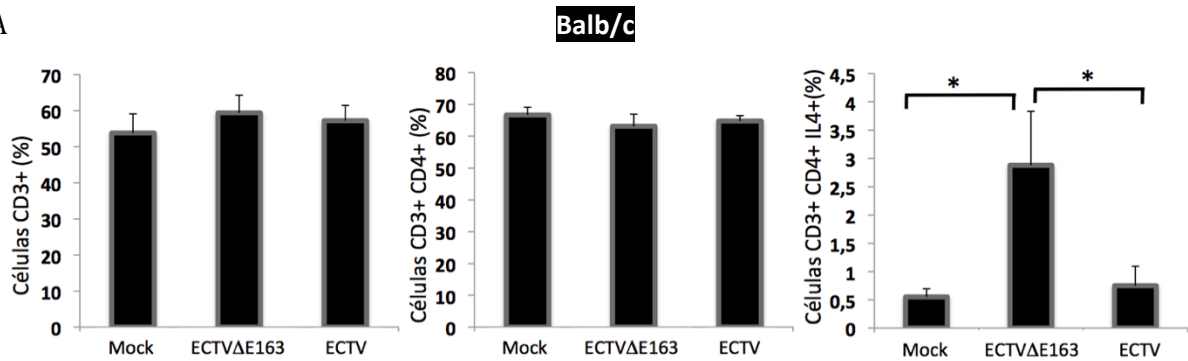
En el marcaje para linfocitos Th2, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células CD3+ (Fig. 47A) entre las infecciones con ambos virus ni con el grupo no infectado (~50-60%). Tampoco encontramos diferencias significativas en el porcentaje total de linfocitos colaboradores (CD3+ CD4+) entre los 3 grupos analizados (~60-70%). En el porcentaje de linfocitos Th2 (CD3+ CD4+ IL4+), sin embargo, encontramos diferencias significativas en las infecciones con ECTV Δ E163 comparadas con las de ECTV en ambas cepas de ratón. En BALB/c detectamos ~3% de linfocitos Th2 en el ganglio poplíteo de la pata inoculada frente al ~0,5% de linfocitos Th2 en animales infectados con ECTV. En B6 detectamos ~4% de linfocitos Th2 frente al ~1% de linfocitos Th2 después de la infección con el virus parental (Fig. 47B). Podemos concluir que hay un mayor porcentaje de células Th2 en una infección con ECTV en ausencia de la proteína E163, tanto en la cepa susceptible infectada por vía FP, como en la cepa de ratones más resistentes infectados por vía IN.

En el análisis de células NK no encontramos diferencias significativas entre la infección con ECTV Δ E163 o con ECTV, en ninguna de las cepas analizadas. En los animales BALB/c observamos mayor presencia y activación de las células NK en los animales infectados frente a los no infectados (Fig. 48A). En B6, sin embargo, encontramos una tendencia a una mayor activación en los animales procedentes de la infección con ECTV ($p=0,051$) (Fig. 48B).

La tinción para analizar los LTc nos reveló que no había diferencias en el porcentaje de células CD3+ ni de LT CD8+ en las cepas BALB/c o B6 (Fig. 49A y B). Sin embargo, en las infecciones en BALB/c hay una mayor activación de los LTc (CD3+ CD8+ GzB+) en los animales infectados con ECTV Δ E163 (~48%) frente a la infección con ECTV (~38%) y los no infectados (~20%). Por el contrario, en B6 encontramos los LTc más activados en la infección con el virus parental (~60%) frente a la infección con el virus mutante o los animales no infectados (~30% en ambos casos).

En CD inmaduras (CD11c+ CD86- CD80-) encontramos un aumento significativo en los animales no infectados respecto de los animales infectados BALB/c (Fig. 50A), también en uno de los estadios de maduración, CD11c+ CD86+ CD80-, tienen un mayor porcentaje en este grupo de animales. En animales infectados con ECTV Δ E163 en BALB/c, encontramos un mayor porcentaje en CD parcialmente maduras, CD11c+ CD86- CD80+, respecto de la infección con ECTV y los animales no infectados. En la infección con B6 (Fig. 50B), no hemos observado ninguna diferencia en éste tipo celular entre los distintos grupos analizados.

A



B

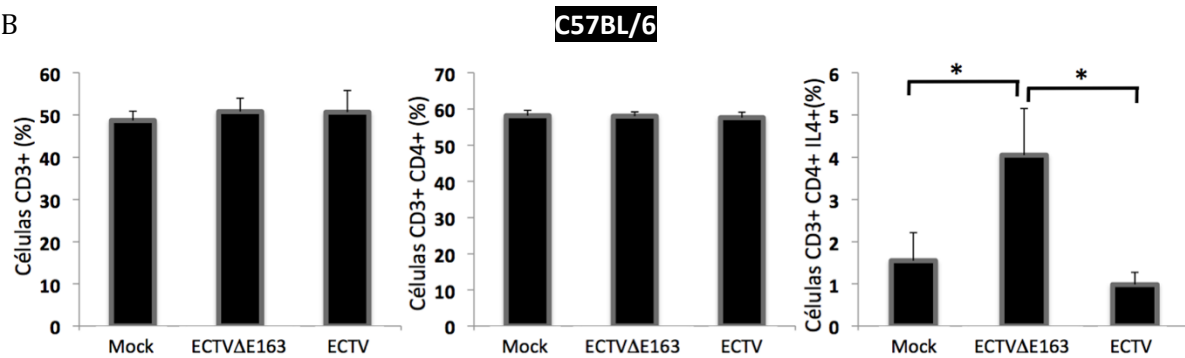
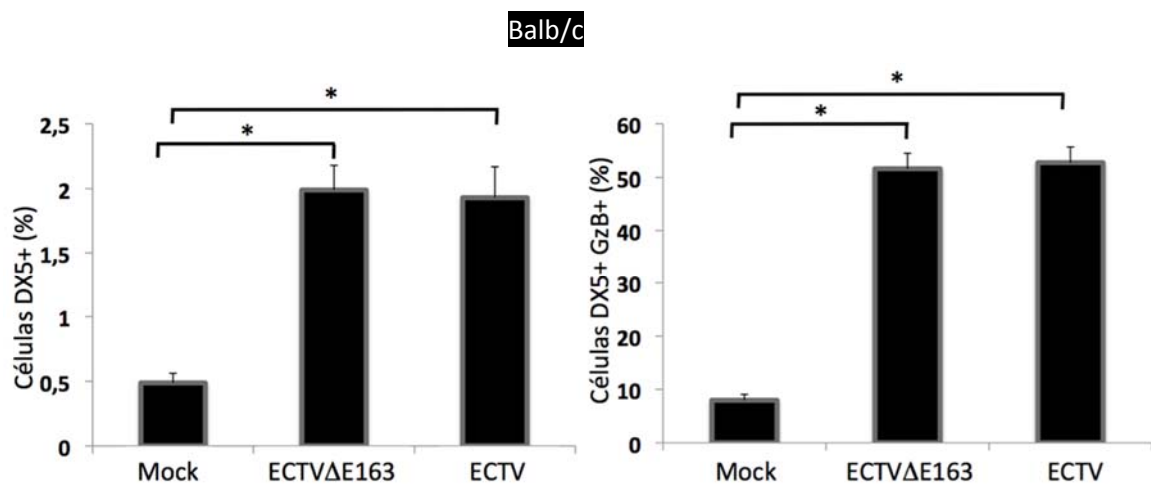


Fig. 47. Porcentaje de células CD3+, linfocitos colaboradores (CD3+CD4+) y linfocitos Th2 (CD3+ CD4+ IL4+) en una infección con ECTVΔE163 y ECTV. Los animales fueron sacrificados a 2 dpi y se les extrajeron los ganglios linfáticos para ser analizados por citometría de flujo. Se muestra la media de 3 grupos de 4 animales (n=12) por grupo (ECTV, ECTVΔE163 y no infectados), las barras son la desviación estándar. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se muestran en las gráficas con un asterisco (*). Los Ab utilizados han sido: anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC y anti-IL4-PECy7. A) Hembras BALB/c infectadas por FP. Se extrajo el ganglio poplíteo de la pata inoculada para ser analizado. B) Hembras B6 infectadas por vía IN de las cuáles se extrajeron los ganglios cervicales superiores para ser analizados.

A



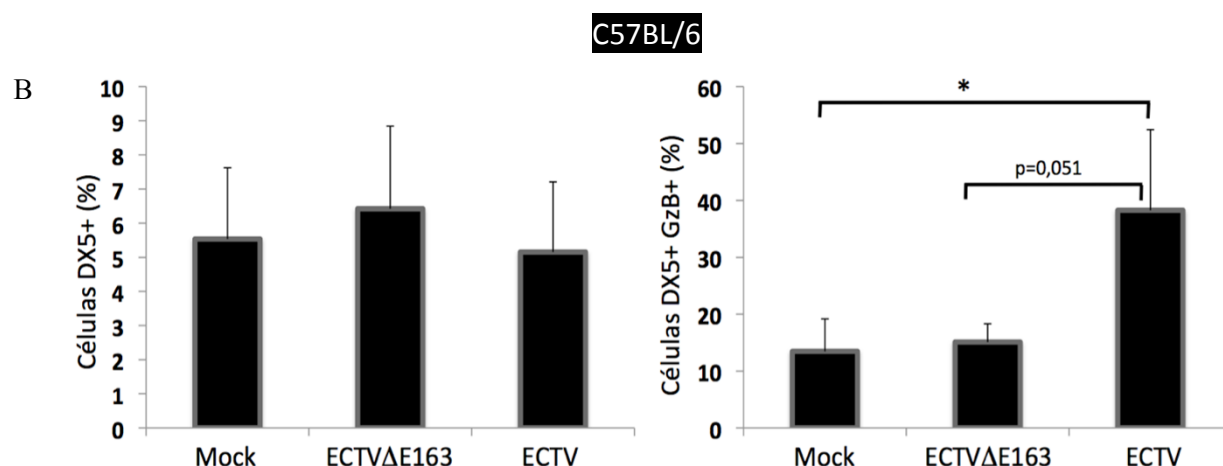


Fig. 48. Porcentaje de células NK (DX5+) y NK activadas (DX5+ GzB+) en una infección con ECTVΔE163 y ECTV. Los animales fueron sacrificados a 2 dpi y se les extrajeron los ganglios linfáticos para ser analizados por citometría de flujo. Se muestra la media de 3 grupos de 4 animales (n=12) por grupo (ECTV, ECTVΔE163 y mock) y su desviación estándar. Las diferencias significativas ($p<0,05$) se muestran en las gráficas con un asterisco (*). Los Ab utilizados han sido: anti-DX5-FITC y anti-GzB-APC. A) Hembras BALB/c infectadas por FP. Se extrajo el ganglio poplíteo de la pata inoculada para ser analizado. B) Hembras B6 infectadas por vía IN de las cuáles se extrajeron los ganglios cervicales superiores para ser analizados.

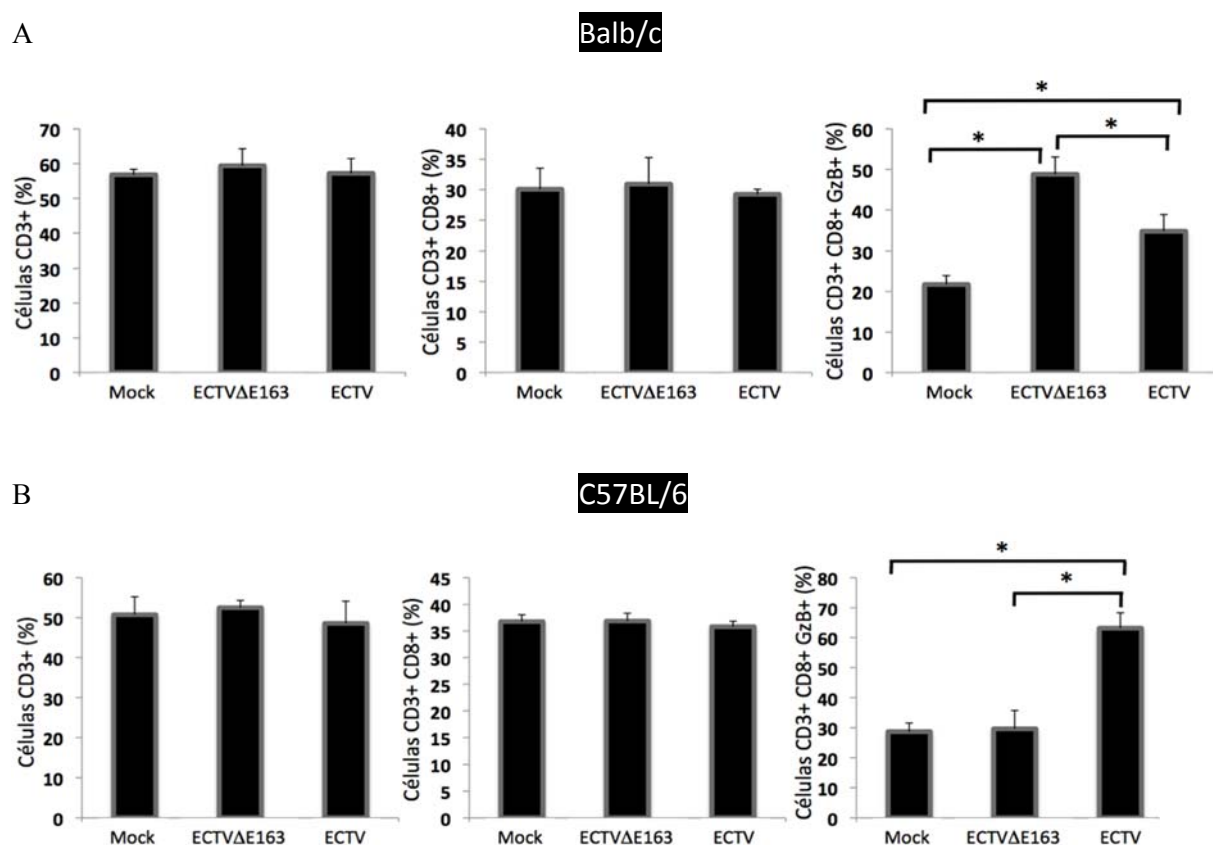
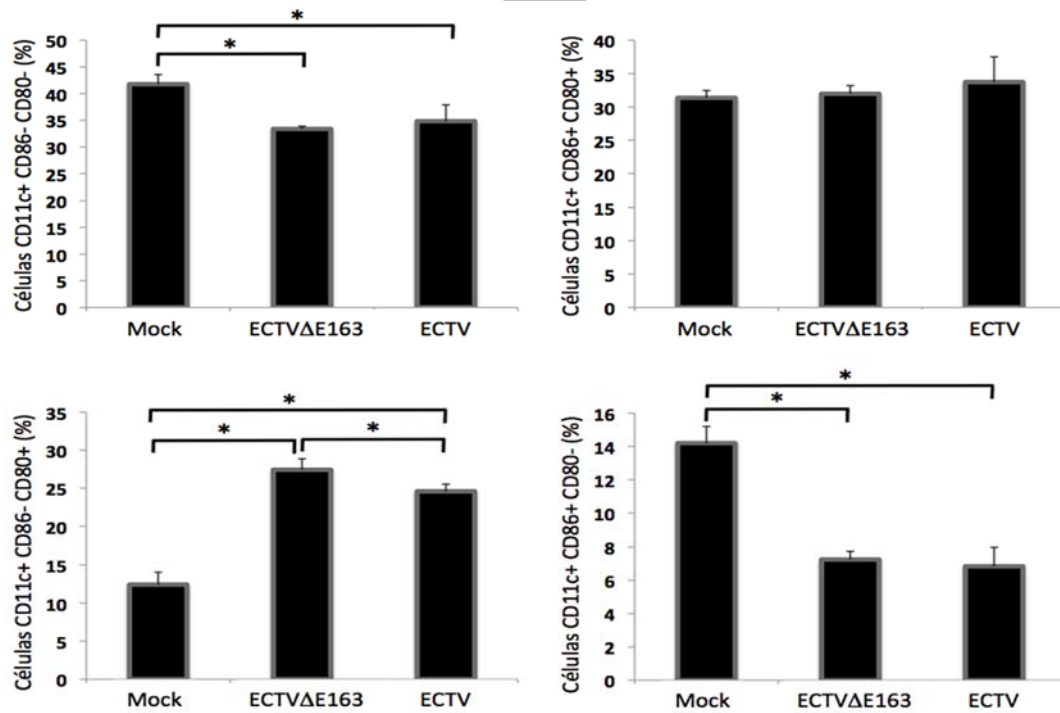


Fig. 49. Porcentaje de células CD3+, LT CD8+ y LTc (CD3+ CD8+ GzB+) en una infección con ECTV y ECTVΔE163. Los animales fueron sacrificados a 2 dpi y se les extrajeron los ganglios linfáticos para ser analizados por citometría de flujo. Se muestra la media de 3 grupos de 4 animales (n=12) por grupo (ECTV, ECTVΔE163 y mock) y su desviación estándar. Las diferencias significativas ($p<0,05$) se muestran en las gráficas con un asterisco (*). Los Ab empleados han sido: anti-CD3-PerCP, anti-CD8-PE y anti-GzB-APC. A) Hembras BALB/c infectadas por vía FP. Se extrajo el ganglio poplíteo de la pata inoculada para ser analizado. B) Hembras B6 infectadas por vía IN de las cuáles se extrajeron los ganglios cervicales superiores para ser analizados.

A

Balb/c



B

C57BL/6

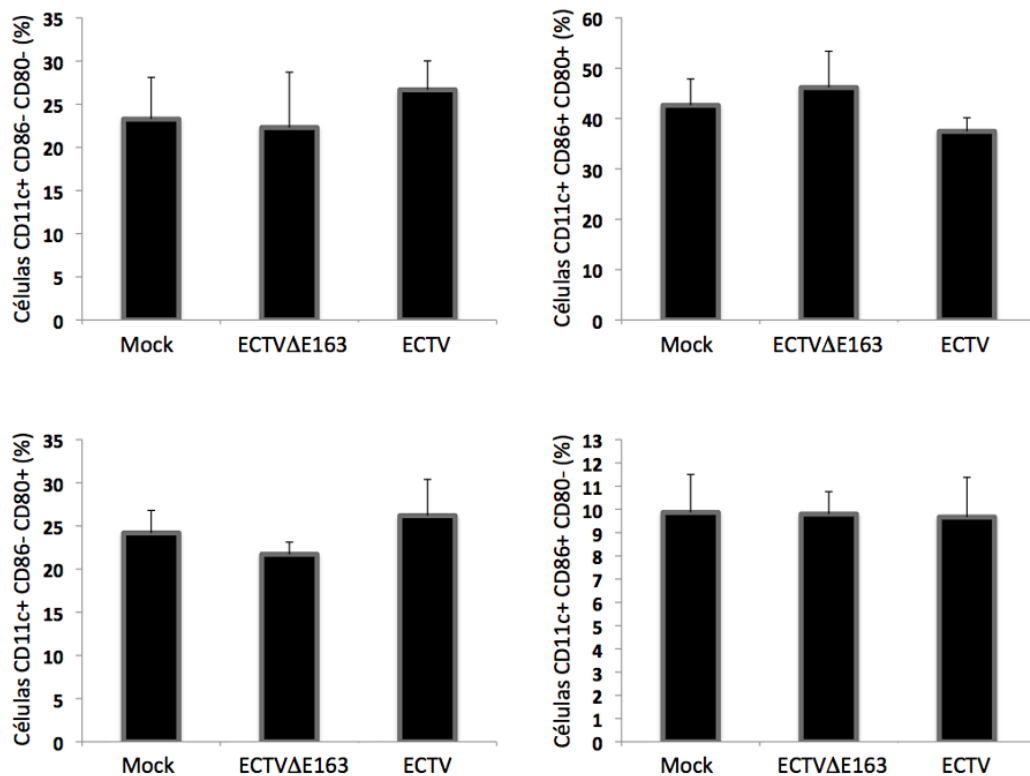


Fig. 50. Porcentaje de CD inmaduras (CD11c+ CD80- CD86-), CD parcialmente inmaduras (CD11c+ CD80- CD86+ y CD11c+ CD80+ CD86-) y CD maduras (CD11c+ CD80+ CD86+) en una infección con ECTVΔE163 y ECTV. Los animales fueron sacrificados a 2 dpi y se les extrajeron los ganglios linfáticos para ser analizados por citometría de flujo. Se muestra la media de 3 grupos de 4 animales (n=12) por grupo (ECTV, ECTVΔE163 y mock) y su desviación estándar. Las diferencias significativas (p<0,05) se muestran en las gráficas con un asterisco (*). Los Ab empleados han sido: anti-CD11c-PE, anti-CD80-PECy7 y anti-CD86-PerCP. A) Hembras BALB/c infectadas por vía FP. Se extrajo el ganglio poplíteo de la pata inoculada para ser analizado. B) Hembras B6 infectadas por vía IN de las cuáles se extrajeron los ganglios cervicales superiores para ser analizados.

| CEPA | VIRUS | CD3+ | CD3+ CD4+ | CD3+ CD4+ IL4+ | CD3+ CD8+ | CD3+ CD8+ GzB+ | DX5+ | DX5+ GzB+ |
|---------|-----------|------|-----------|----------------|-----------|----------------|------|-----------|
| Balb/c | ECTV | | | | | | | |
| | ECTVΔE163 | | | + | | + | | |
| C57BL/6 | ECTV | | | | | + | | |
| | ECTVΔE163 | | | + | | | | |

Tabla 12. Resumen del análisis celular del punto 4.3.6.10. Se muestran las diferencias significativas (+) encontradas en las distintas poblaciones celulares analizadas en la infección con ECTV y ECTVΔE163 en ratones Balb/c y B6.

| CEPA | VIRUS | CD11c+ CD86- CD80- | CD11c+ CD86+ CD80+ | CD11c+ CD86- CD80+ | CD11c+ CD86+ CD80 - |
|---------|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Balb/c | ECTV | | | | |
| | ECTVΔE163 | | | + | |
| C57BL/6 | ECTV | | | | |
| | ECTVΔE163 | | | | |

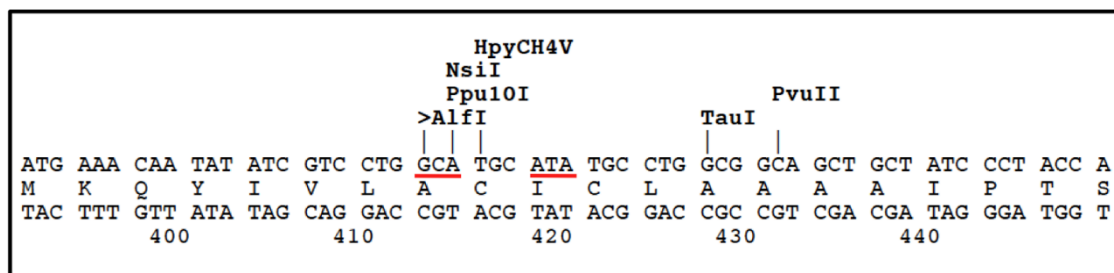
Tabla 13. Resumen del análisis de CD maduras del punto 4.3.6.10. Se muestran las diferencias significativas (+) encontradas en CD maduras en la infección con ECTV y ECTVΔE163 en ratones Balb/c y B6.

4.4 35-kDa *in vivo*

4.4.1 Análisis del gen *35kDa* (*EVN001*) en ECTV35kDa-mut

La proteína 35kDa es una vCKBP pero la función que pudiera tener en el progreso de *mousepox* provocada por ECTV no está estudiada, por ello se generó, por el método de virus dominantes transitorios para ECTV, un virus mutante que no expresaba la proteína 35-kDa (ECTV35kDa-mut). Este virus fue generado por Louis Webb de nuestro laboratorio. El virus mutante no expresa la proteína 35-kDa porque fue mutagenizado el codón iniciador, fueron introducidos 2 codones de terminación prematuros en este gen y se introdujo una delección de nucleótido que daba lugar a un cambio de fase en la lectura de la proteína. Partimos de 6 clones (placas blancas) para analizar y crecer para su posterior uso en experimentos *in vivo*. Extrajimos el ADN de cada clon con fenol-cloroformo para amplificar el gen *35kDa* con oligonucleótidos específicos para su posterior secuenciación por *Sanger*. Los resultados obtenidos fueron que los clones 2-6 eran como el virus parental (Fig. 51A), no tenían ninguna mutación en dicha región genómica pero el clon 1 era un virus mutante (Fig. 51B). Tenía las mutaciones descritas en la Tabla 12.

A



B

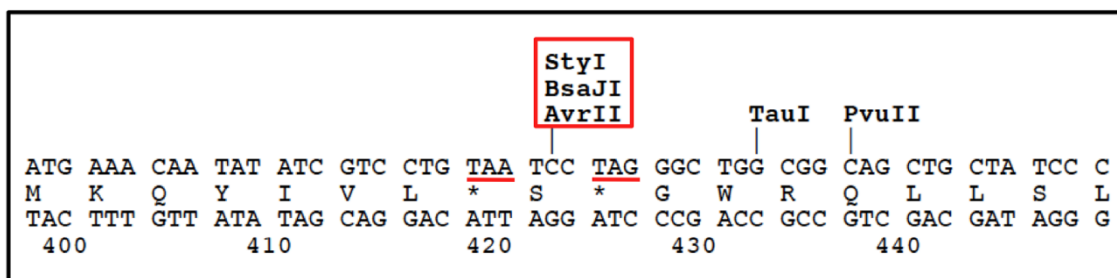


Fig. 51. Secuenciación por *Sanger* del gen *35kDa* en los clones de 1 a 6 de ECTV35kDa-mut. A) Secuencias correspondientes a los clones de 2-6 de ECTV35kDa-mut. B) Secuencia correspondiente al clon 1 ECTV35kDa-mut.

4.4.2 ECTV35kDa-mut no expresa la proteína 35-kDa

Infectamos una monocapa de células BS-C-1 con ECTV35kDa-mut (clon 1) y ECTV a una moi de 2-4 ufp/célula, se recogieron las infecciones a 48 hpi. El SN de las infecciones se concentró 20 veces y realizamos un WB para comprobar la ausencia de expresión de la proteína 35-kDa en ECTV35kDa-mut (Fig. 53A). Realizamos también otro WB para detectar la expresión de la proteína CrmD como control de expresión (Fig. 53B). A partir de este momento decidimos utilizar el clon 1 de ECTV35kDa-mut para nuestros próximos experimentos *in vivo*.

| Posición genómica | Mutación | |
|-------------------|-------------|---------------|
| 2754 | Delección | G2754 |
| 2755 | Sustitución | C2755T |
| 2756 | Insertión | A2756 |
| 2758 | Delección | G2758 |
| 2760 | Sustitución | A2760C |
| 2760 | Sustitución | T2763G |
| 2765 | Sustitución | C2765G |

Tabla 12. Mutaciones en el gen *35kDa* del clon 1 de ECTV35kDa-mut.

| ECTV |
|------------------------------------|
| M K Q Y I V L A C I C |
| ATGAAACAATATATCGTCCTGGC-ATGCATATGC |
| ATGAAACAATATATCGTCCTG-TAAT-CCTAGGG |
| ECTV35kDa-mut |

Fig. 52. Alineamiento entre ECTV y ECTV35kDa-mut en el gen *35kDa*.

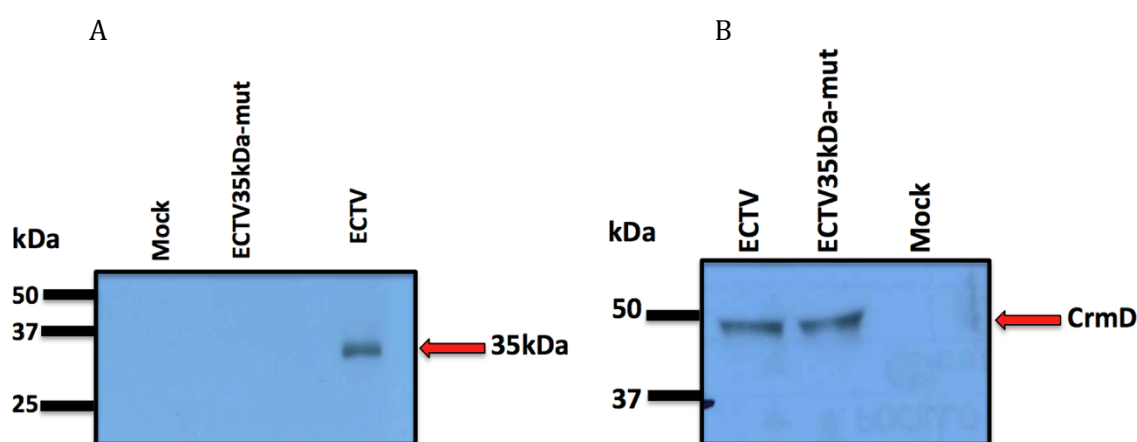


Fig. 53. Expresión de proteína 35-kDa y CrmD en infecciones con ECTV35kDa-mut y ECTV. Se infectaron células BS-C-1 con ambos virus, y el SN de las infecciones se utilizó para realizar un WB con un Ab anti-35kDa (A) o con Ab anti-CrmD (B). A la izquierda señalamos los marcadores de masa molecular (kDa). La flecha de la derecha indica la proteína 35kDa (A) y CrmD (B).

4.4.3 ECTV35kDa-mut está atenuado respecto a ECTV en una infección *in vivo*

Realizamos un experimento *in vivo* con hembras BALB/c infectadas con ECTV35kDa-mut y ECTV para analizar posibles diferencias en el progreso de *mousepox* al no expresarse la proteína 35-kDa. Infectamos grupos de 5 ratones por vía FP. Las dosis de infección fueron 10, 10^2 , 10^3 y 10^4 ufp/animal para ECTV35kDa-mut y comparamos con las infecciones con ECTV con las dosis de 1 y 10 ufp/animal. Monitorizamos durante 21 dpi los síntomas de enfermedad, la supervivencia, el peso (Fig. 54A-C) y la inflamación de la pata inoculada (Fig. 54D). Encontramos que no había un efecto dosis muy claro al comparar las diferentes dosis de infección del virus mutante ya que en 10^3 ufp hubo más muertes que con 10^4 ufp (Fig. 54). Concluimos que la DL_{50} es $> 10^3$ - 10^4 .

En la dosis de 10 ufp/animal encontramos que no hay ninguna muerte con el virus mutante. Sin embargo, con el virus parental mueren todos los animales, hay una importante pérdida de peso además de síntomas de enfermedad que llegan a 3,5 (Fig. 54). Al comparar las diferentes dosis de infección con el virus mutante, no hay un claro efecto de dosis viral (Fig. 54C). Con respecto a los síntomas de enfermedad, la dosis menor

(10^2 ufp) es algo menos virulenta que las dos dosis superiores (10^3 , 10^4 ufp) aunque entre estas últimas no apreciamos diferencias. Es algo más acentuada la pérdida de peso con 10^4 ufp respecto de las 2 dosis superiores pero en la supervivencia encontramos más muertes con 10^3 ufp respecto de 10^4 ufp (Fig. 54C). Al comparar la inflamación de la pata inoculada entre los animales infectados con el virus mutante frente al parental con 10 ufp (Fig. 54D), no encontramos diferencias significativas entre ellos hasta el 10 dpi. Tampoco observamos diferencias en inflamación de la pata entre las distintas dosis del virus mutante (Fig. 54D).

4.4.4 Secuenciación del genoma completo de ECTV35kDa-mut

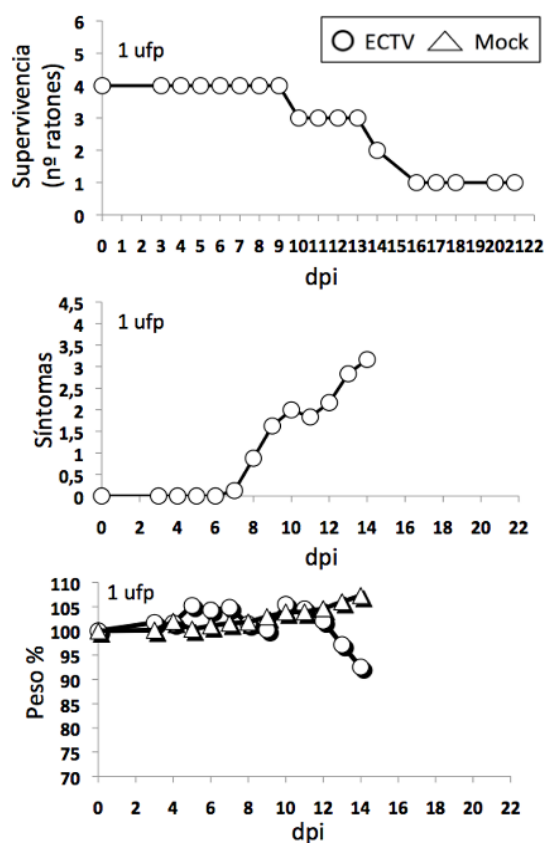
Para verificar las mutaciones en el gen *35kDa* y descartar otras mutaciones en el resto del genoma de nuestro virus mutante, determinamos por secuenciación masiva con Illumina la secuencia del genoma de ECTV35kDa-mut. Infectamos una monocapa de células BS-C-1 con ECTV35kDa-mut a una moi baja (0,07 ufp/célula) y recogimos la infección a 72 hpi. Purificamos el virus por colchón de sacarosa para extraer, purificar y amplificar el ADN viral para secuenciación masiva (materiales y métodos, sección 3.16). Purificamos el genoma viral a partir de un gel de agarosa (Fig. 55A), amplificamos el genoma con la polimerasa de *Phi29* (Fig. 55B) y, por último, verificamos la ausencia de contaminación bacteriana realizando una amplificación con oligonucleótidos específicos (Tabla 3) para el gen ribosomal 16S (Fig. 55C). Se utilizaron ~ 4 μ g de ADN para la secuenciación masiva.

Con ADN amplificado con la polimerasa de *Phi29* se generó una biblioteca TruSeq y se secuenció con la técnica de Illumina en un equipo HiSeq. Se obtuvieron 1.217.907 millones de secuencias totales, de las cuáles se alinearon 1.123.639 con el genoma de referencia de ECTV Naval (Mavian et al., 2014). El tamaño medio de lectura fue de 50 pb. La cobertura total del genoma fue de 270x (Tabla 13). Estas secuencias se ensamblaron con el programa bowtie mapeando las lecturas en el genoma de referencia de ECTV Naval. El gen *35kDa* está duplicado en el genoma de ECTV (*EVN001* + *EVN206*), tiene 740 pb y su posición genómica es 2.035-2.775 para *EVN001* y 204.654-205.397 para *EVN206* (Fig. 56). El gen adyacente es un gen de la familia de las ankirinas que también está duplicado (*EVN003* + *EVN204*) y tiene 1.760 pb (*EVN003*: 3.108-4.868 y *EVN204*: 202.561-204.324) (Fig. 56). Tras la obtención de las secuencias verificamos la presencia de las mutaciones descritas en la Tabla 12. Inesperadamente encontramos 2 deleciones puntuales en el gen de las *ankirinas* adyacente al gen *35-kDa* que interrumpen la pauta de lectura en este gen y no permiten su expresión. Los nucleótidos deleccionados en el gen *EVN003* fueron G4844 y T4845 (Fig. 56).

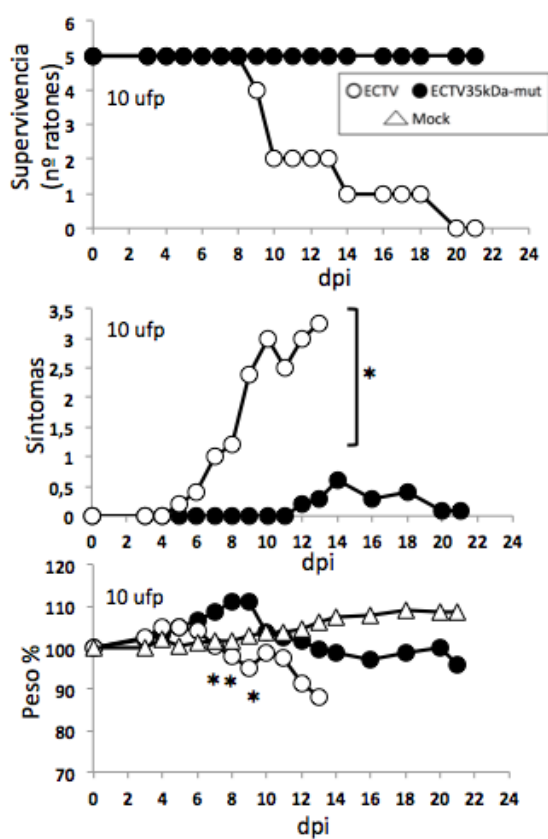
Como nos sucedió en la secuenciación del genoma completo de ECTV Δ E163, obtuvimos secuencias a partir del nucleótido 177 y hasta el 207.442 del genoma de ECTV35kDa-mut ya que en las ITRs hay zonas ricas en A+T y cortas de repeticiones invertidas que dificultan la secuenciación de los extremos del genoma. Podemos concluir que ECTV35kDa-mut no expresa la vCKBP 35-kDa pero al tener 2 deleciones en el gen de las *ankirinas* (*EVN003* y *EVN204*), se altera la pauta de lectura de la proteína y tampoco se expresa ésta.

Por lo tanto, no pudimos concluir que los resultados obtenidos en el experimento *in vivo* sean consecuencia exclusiva de la falta de expresión de la vCKBP.

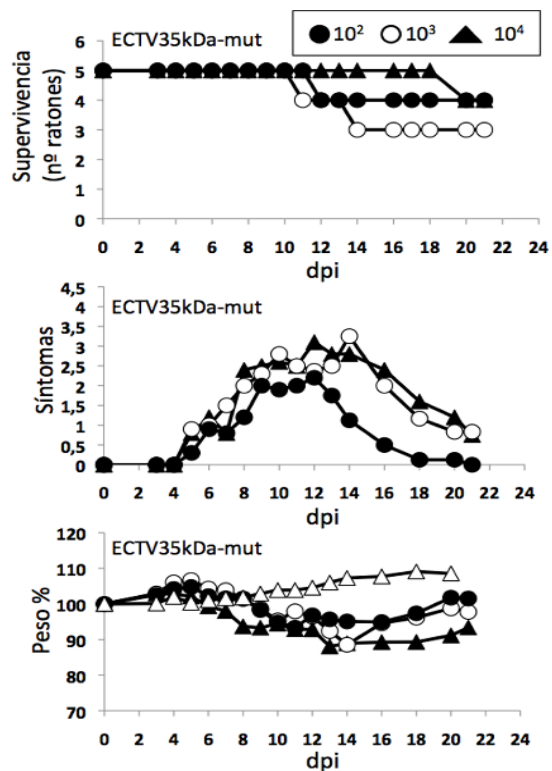
A



B



C



D

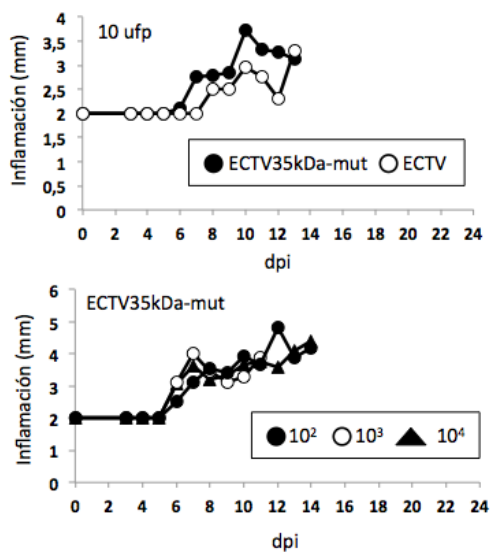


Fig. 54. Progreso de *mousepox* con ECTV35kDa-mut respecto de ECTV. Infectamos grupos de 5 hembras BALB/c por FP en cada dosis de infección (10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4 ufp/animal) con ECTV35kDa-mut. Las dosis empleadas para ECTV fueron 1 y 10 ufp/animal. Monitorizamos durante 21 dpi los síntomas de enfermedad, la pérdida de peso, la supervivencia y la inflamación de la pata inoculada. Se muestra la media en cada punto y los asteriscos (*) indican que hay una diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto del virus parental.

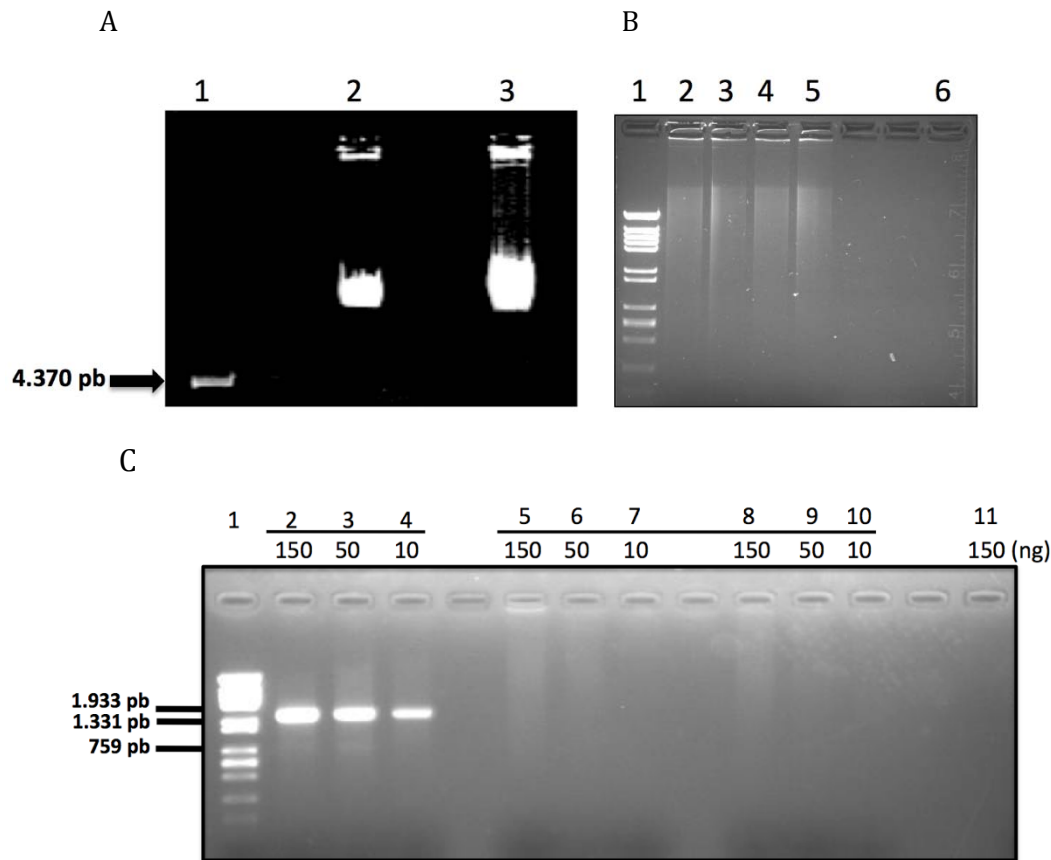


Fig. 55. Preparación del genoma viral de ECTV35kDa-mut para secuenciación masiva. Geles de agarosa. A) ADN extraído con fenol-cloroformo y procedente de 2 infecciones independientes con ECTV35kDa-mut (carriles 2 y 3), en células BS-C-1. Carril 1: marcadores de masa molecular (pb). B) Genoma amplificado de ECTV35kDa-mut con la polimerasa de *phi29* (carriles 2-5) y control negativo (carril 6), carril 1: marcadores de masa molecular (pb). C) Hemos cargado producto de PCR resultante de la amplificación con los oligonucleótidos 27F y 1492R para 16S con ADN de ECTV35kDa-mut. Carriles: 1, marcadores de masa molecular (pb); 2-4, 10, 50 y 150 ng de genoma control con contaminación bacteriana, respectivamente; 5-7 y 8-10, purificaciones en paralelo a partir de 10, 50 y 150 ng de genoma del virus mutante, respectivamente, y 11, control negativo.

EVN003 (EVN204):

ECTV-Naval: GATGC**GT**ACAA

ECTV35kDa-mut: GATGC -- ACAA

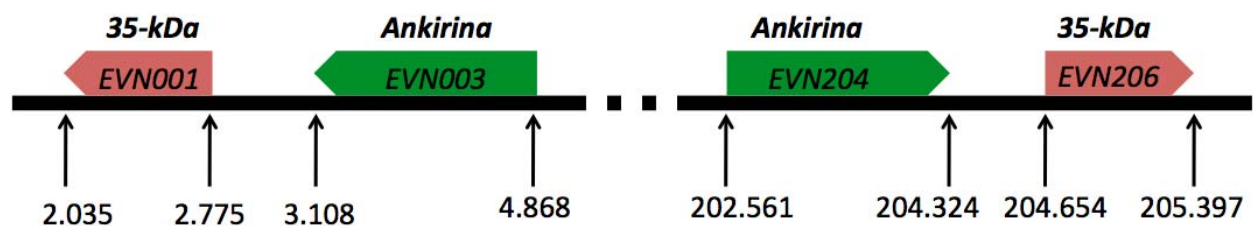


Fig. 56. Representación esquemática de los genes 35kDa (EVN001) y ankirinas (EVN003) en ECTV. Hemos representado el sentido de la transcripción en dichos genes. Los números indican la posición genómica de cada gen.

| | Nº | Tamaño medio |
|---------------------------|------------------|--------------|
| Lecturas obtenidas | 1217907 | 50 |
| Alineadas | 1123639 (92.26%) | 50 |
| No alineadas | 94268 (7.74%) | 50 |

Tabla. 13. Resultados del ensamblaje de las lecturas obtenidas por Illumina. Se mapearon las lecturas con el genoma de referencia ECTV Naval con el programa *bowtie*.

5. DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Interacción de proteínas con GAGs

La interacción con GAGs es un mecanismo de acción muy conservado y relevante para la actividad de algunas proteínas. Esta asociación evita su difusión, su degradación por proteasas, aumenta la concentración local y permite la acción sobre sus respectivos ligandos, entre otras posibles funciones. La unión a GAGs tiene además un papel de suma importancia en la interacción patógeno-hospedador.

La adhesión de un virus a la superficie celular mediada por GAGs puede determinar el tropismo o el rango de hospedador (Shih et al., 2009) facilitando la interacción con el receptor celular y la entrada. Las proteínas H3 (Lin et al., 2000), D8 (Shih et al., 2009) y A27 de VACV (Hsiao et al., 1998; Shih et al., 2009), son otros ejemplos de asociación a GAGs que facilita la unión y la entrada del virus a la célula. Otro ejemplo bien caracterizado es la glicoproteína de la envuelta viral gp120 de HIV que media la unión a la célula a través de GAGs (Saphire et al., 2001).

Algunas de las estrategias de los grandes virus de genoma ADN herpesvirus y poxvirus para sabotear la respuesta inmune del hospedador consisten en expresar proteínas homólogas a citoquinas, CKs o a sus receptores celulares, o vCKBPs (Alcami, 2003). La glicoproteína B18 de VACV que une IFN α/β e inhibe su función, interacciona con GAGs para retenerse en la superficie celular y potenciar su efecto en los tejidos infectados (Alcami et al., 2000; Symons et al., 1995). Las zonas de unión a GAGs en la proteína y sus diferentes afinidades a los distintos tipos de GAGs han sido descritos (Montanuy et al., 2011). Estudios recientes en nuestro laboratorio han demostrado que la proteína B18 necesita de la interacción con GAGs para ejercer su función inhibitoria sobre el IFN α/β en ratones infectados con VACV, poniendo de relieve la importancia de esta asociación para su función *in vivo* (Alonso-Lobo J., Montanuy I. y Alcamí A., resultados no publicados). Otros ejemplos son las vIL18BP de VARV (D7) (Esteban et al., 2004) y del virus *molluscum contagiosum* (MC54) (Xiang and Moss, 2003) que son capaces de unirse a IL18 y a GAGs simultáneamente por diferentes zonas de unión.

5.2 Mecanismos de acción de las vCKBPs

La interferencia del sistema de CKs es una estrategia ampliamente utilizada por los poxvirus y herpesvirus. Las vCKBPs son proteínas solubles de unión a CKs sin homología celular. Utilizan diferentes mecanismos de acción inhibiendo la interacción con el CKR o con los GAGs. Además, ellas mismas pueden unirse simultáneamente a GAGs (Heidarieh et al., 2015) (Fig. 3B y C).

5.2.1 Mecanismo de acción de 35-kDa de ECTV

A pesar de compartir el mismo plegamiento tridimensional, las proteínas 35-kDa y A41 de poxvirus poseen diferentes mecanismos de acción. La vCKBP 35-kDa impide la interacción de la CK con el GPCR inhibiendo la quimiotaxis celular y la transducción de señales (Alcami et al., 1998; Lalani et al., 1998; Smith et al., 1997). La proteína ortóloga de MYXV, M-T1, tiene además la habilidad única de unirse ella

misma simultáneamente a GAGs (Seet et al., 2001a) (Fig. 3C). En diferentes trabajos donde se ha resuelto la estructura tridimensional de complejos entre 35-kDa y CKs o se ha realizado mutagénesis dirigida, se han identificado los residuos implicados en la interacción vCKBP-CK, responsabilizando a una zona concreta de la proteína que exhibe una carga electronegativa superficial en conjunto, situada en la lámina- β II y que incluye al *loop* 2-4 de la vCKBP (Fig. 4C). Estos residuos interaccionan con el extremo N-terminal, residuos situados en el *loop* 40s, *loop* 20s y en la tercera lámina- β de las CKs (Beck et al., 2001; Kuo et al., 2014; Seet et al., 2001a; Zhang et al., 2006a). Los *loops* 40s y 20s de las CKs también están implicados en la interacción con GAGs (Amara et al., 1999; Graham et al., 1996; Laurence et al., 2001; Proudfoot et al., 2001), por lo que además de interferir la interacción con el receptor celular, la 35-kDa podría interferir la unión de las CKs con GAGs, cómo también se ha descrito con la proteína M3 de MHV-68 (Webb et al., 2004). Otras vCKBPs que también inhiben la función de las CKs interaccionando con el dominio de unión al GPCR son el dominio SECRET de poxvirus (Alejo et al., 2006) o la proteína R17 de herpesvirus Perú que además también se une a GAGs ella misma (Lubman et al., 2014).

Nosotros hemos aportado en la presente tesis nuevos datos acerca del mecanismo de acción de 35-kDa de ECTV, 35-kDa de CPXV-BR y 35-kDa de CPXV-Cheetah con el uso de la citometría de flujo. Hemos demostrado que la vCKBP 35-kDa es capaz de impedir la unión de una CK (CCL21) a la superficie celular a través de su interacción con GAGs (Fig. 27). Estos resultados completan el modelo del mecanismo de acción de la 35-kDa. Además de impedir la interacción de la CK con su CKR específico, la 35-kDa es capaz de impedir la formación del gradiente quimiotáctico revelando la gran eficiencia de inhibición de la quimiotaxis celular de esta vCKBP.

Por otro lado, a pesar de localizar en la secuencia primaria dos *clusters* de residuos básicos que podrían ser zonas de unión a GAGs en la 35-kDa de ECTV ($^{160}\text{BXXXXBXXB}^{168}$ y $^{175}\text{XBBBXXB}^{181}$) y en 35-kDa de CPXV-BR ($^{160}\text{BXXXXBXXB}^{168}$ y $^{175}\text{XBBBXX}^{180}$), no hemos sido capaces de demostrar mediante diferentes técnicas (SPR y FACS) la posible interacción de la 35-kDa de ECTV o CPXV-BR con la superficie celular (Fig. 26).

5.2.2 Mecanismo de acción de E163

En un trabajo anterior de nuestro laboratorio se realizaron ensayos de unión por SPR en un biosensor BIAcore X para caracterizar los ligandos de la proteína E163 (Ruiz-Arguello et al., 2008) utilizando todas las CKs (humanas y murinas) disponibles comercialmente. Se observó que se unía con alta afinidad a 9 CKs, 6 CKs CC (CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27 y CCL28) y 3 CKs CXC (CXCL12 α , CXCL12 β y CXCL14). Únicamente en los casos de CCL24 y CCL27 encontraron que no unía la CK humana. Nosotros hemos encontrado que mCXCL12 α no se une a E163 con gran afinidad, sin embargo, sí lo hace mCXCL13 (Fig. 17 y Tabla 7). Estas variaciones podrían estar relacionadas con el uso de un biosensor diferente (BIAcore X100) o con la actividad relativa de cada lote de CK utilizado en los experimentos. E163 une las CKs con una afinidad que está en el orden de nM (Ruiz-Arguello et al., 2008) (Tabla 7) al igual que la CK con su GPCR. Al mismo tiempo, otro grupo sacó unas conclusiones similares con la proteína ortóloga A41 (Bahar et al., 2008). Lo que además observaron ambos grupos es que la vCKBP no era capaz de inhibir la

quimiotaxis celular en ensayos *in vitro*. Por medio de diferentes técnicas se demostró que E163 une la CK por el dominio de unión a GAGs de la CK (Ruiz-Arguello et al., 2008). Además, por SPR se observó que en presencia de H se perdía la interacción entre la vCKBP y las CKs de un modo dependiente de dosis. Otras vCKBPs que también utilizan este mecanismo de acción, interaccionar con el dominio de unión a GAGs de la CK, son **M-T7** de MYXV (Bartee et al., 2013), **gG1** y **gG2** de HSV-1 y HSV-2 (Viejo-Borbolla et al., 2012) o **gG** de EHV que une a las CKs tanto por el dominio de unión al CKR como el dominio de unión a GAGs (Viejo-Borbolla et al., 2010).

5.2.2.1 Caracterización de las zonas de unión a GAGs en E163

E163 es una proteína de unión a GAGs (Ruiz-Arguello et al., 2008), une H, condroitín sulfato A, condroitín sulfato B y HS, aunque con diferente afinidad. Se identificaron dos regiones como posibles zonas de unión a GAGs en E163, ¹⁵²LKPRDFKT¹⁵⁹ (B) y ²¹³RKILKKKF²²⁰ (C). Nosotros, además, identificamos una tercera opción, ¹⁴¹KTKDFMK¹⁴⁷ (A). En la presente tesis hemos caracterizado las zonas de unión a GAGs de la proteína E163. Por mutagénesis dirigida generamos 7 proteínas recombinantes mutadas en la zona de unión a GAGs mutando a Ala los residuos básicos de las zonas A, B y C (Tabla 6). Comprobamos por SPR, utilizando de ligando una superficie sintética de GAGs (H) y pasando como analitos las proteínas E163, E163-1 a E163-7, que las zonas A, B y C son responsables de la unión a H. Las proteínas E163-1 a E163-5 pierden la unión a GAGs (Fig. 13). Sin embargo, El mutante doble E163-6 (A-C-B+) pierde sólo parte de la unión porque posee la región B intacta. Es sorprendente que el mutante triple, E163-7, no pierde la unión a GAGs y una posible explicación es que con las tres regiones mutadas se produzca un cambio en el plegamiento tridimensional de la proteína que pueda estar exponiendo al soluto residuos básicos previamente protegidos en el núcleo de la proteína o alterando los puentes disulfuro presentes en la misma (Fig. 9).

Para verificar estos resultados en una superficie celular utilizamos células CHO-K1 que expresan todos los tipos de GAGs y células CHO-618 que son deficientes en la síntesis de GAGs. Por FACS, concluimos que las zonas A, B y C son las regiones de unión a GAGs en la vCKBP (Fig. 15). Para que E163 se una a la superficie celular debe estar presente la región B, ya que E163-5 (B-, C-, A+) y E163-4 (B-, A-, C+) pierden la unión a la superficie celular, pero no sucede así en E163-6 (A-, C-, B+), dónde únicamente está presente la región B. Nuestros resultados sugieren que para la pérdida de unión a GAGs en E163 es necesaria la desaparición de la región B, pero simultáneamente con otra de las regiones A o C, ya que la proteína mutante en la región B únicamente, E163-1, no es capaz de perder la unión de un modo significativo al menos en tres experimentos independientes (resultados no mostrados). Por otro lado, hemos observado que E163 presenta una unión basal con las células CHO-618, pero no existen diferencias significativas en la unión, entre las distintas proteínas mutantes y E163, indicando que la pérdida de unión que observamos en CHO-K1 es debida a la presencia de GAGs específicamente (Fig. 16). La unión a CHO-618 podría estar relacionada en parte con la utilización del Ab policlonal anti-E163 y por uniones inespecíficas o específicas no descritas. Por lo tanto, podemos afirmar que mediante el empleo de diferentes técnicas, mutagénesis

dirigida, SPR y FACS hemos caracterizado las zonas de unión a GAGs en la proteína E163 (¹⁵²LKPRDFKT¹⁵⁹ (B), ²¹³RKILKKKF²²⁰ (C) y ¹⁴¹KTKDFMK¹⁴⁷ (A)). Además, para cerciorarnos que no hay diferencias con la proteína expresada por ECTV y la proteína recombinante, realizamos un experimento de unión a superficie de células CHO-K1, con SN de células infectadas con ECTV o ECTVΔE163, y observamos que E163 se une a la superficie celular mientras que con el SN procedente del virus mutante no se da dicha interacción (Fig. 14).

5.2.2.2 Las zonas de unión a GAGs y de unión a CKs en E163 no son totalmente independientes

En un trabajo anterior (Bahar *et al.*, 2008), se resolvió la estructura tridimensional de A41 y realizaron un modelado *in silico* localizando la posible región de unión a CKs de A41, en la misma zona descrita previamente para 35-kDa, residuos que conforman una región con carga local electronegativa localizados en la región de la lámina-β II (Zhang *et al.*, 2006a) y una región con residuos hidrofóbicos entre los que se sitúa la F181 conservada en ambas proteínas y que también establece interacción con la CK en el modelado. Nosotros, empleando como modelo estructural la proteína A41, señalamos las regiones A, B y C en la estructura tridimensional de la proteína y observamos que se situaban en la región opuesta a la lámina-β II, es decir, más cercanas a la lámina-β I (Fig. 9). Al realizar ensayos de unión y de cálculo de afinidad por SPR entre las proteínas E163-1 a E163-5 y algunos de sus ligandos observamos que las zonas de unión a GAGs y a CKs en E163 no son del todo independientes (Fig. 17 y Tabla 7). Si bien estas proteínas mutantes siguen uniendo CKs, parece que se altera el grado de unión, sobre todo en E163-5, y que las regiones B y C pueden afectar más a la unión a CKs que la región A.

5.2.2.3 E163 es capaz de oligomerizar

En nuestros resultados hemos detectado por diferentes técnicas que E163 es capaz de oligomerizar. Por cromatografía de exclusión molecular detectamos 1 pico con 2 hombros, el primero corresponde a un dímero (~66 kDa) y el segundo a un monómero (~33 kDa) (Fig. 19 y 20). Por SPR utilizamos la proteína E163 como analito y como ligando detectando nuevamente, unión entre ellas (Fig. 21). En la mayoría de nuestros WB realizados en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) hemos detectado una banda inferior de ~33 kDa y una superior de ~66 kDa (Figs. 6 y 20). Por lo tanto podemos afirmar que la proteína E163 es capaz de oligomerizar aunque no se ha destacado esta propiedad en ninguna de las publicaciones previas (Bahar *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2001; Ruiz-Arguello *et al.*, 2008). El significado biológico de esta propiedad de la vCKBP es desconocido.

5.2.2.4 E163 es capaz de interferir la unión de CCL21 a una superficie celular mediada por GAGs

Mediante FACS y empleando CCL21 biotinilada hemos demostrado que E163 es capaz de inhibir la interacción de CCL21 a una superficie celular (CHO-K1) mediada por GAGs. Esta propiedad de la proteína E163 solamente la podemos observar en el mutante de unión a GAGs E163-5, ya que al no unirse ella misma simultáneamente a GAGs, mediante esta técnica podemos demostrar que impide la asociación CK-

GAGs. Con la proteína parental no es posible porque además de unirse a CCL21 queda retenida ella misma a la superficie de las células CHO-K1 (Fig. 18F y G).

Con estos experimento podemos afirmar que E163 impedirá la correcta presentación del gradiente quimiotáctico necesario para la haptotaxis de los leucocitos. El posible modelo que planteamos que sucede *in vivo* es que E163 es secretada de las células infectadas, se une a GAGs y forma una especie de alfombra en la superficie celular y al unir simultáneamente las CKs secretadas impide la presentación de éstas al sistema inmune. Podría estar actuando en forma dimérica. Aunque no inhibe la quimiotaxis celular *in vitro*, al no interferir la unión CK-GPCR (Bahar et al., 2008; Ruiz-Arguello et al., 2008), su mecanismo de acción *in vivo* sería la formación del complejo E163-CK adherido a la superficie celular impidiendo la correcta señalización a través de los CKRs al alterar la estructura cuaternaria de las CKs, es decir, probablemente interfiere en la capacidad de oligomerización de las CKs. Es un hecho contrastado que tanto la interacción con GAGs como la oligomerización son aspectos esenciales en la actividad de las CKs *in vivo* (Proudfoot et al., 2003). En este sentido, se ha demostrado que CCL5, CCL4 y CCL2 mutadas en su zona de unión a GAGs mantenían su función quimiotáctica *in vitro* (Ali et al., 2000), pero *in vivo* no eran capaces de promover la migración celular (Proudfoot et al., 2003) ni atravesar una monocapa endotelial por quimiotaxis (Baltus et al., 2003). La versión mutante de CCL18 que no une GAGs deja de interactuar con los leucocitos circulantes revelando la esencialidad de esta asociación para su función (Krohn et al., 2013). Por otro lado, también se ha descrito la presencia de GAGs posibilita la oligomerización de las CKs y es la estructura cuaternaria de este complejo lo que guiaría la función de cada CK *in vivo*. Las variantes monoméricas CCL5, CCL4, y CCL2, son capaces de activar la quimiotaxis celular *in vitro* (Laurence et al., 2000; Paavola et al., 1998; Proudfoot et al., 2003) sin embargo, *in vivo* no fueron capaces de promover la migración celular, recalando así la necesidad de oligomerizar para su actividad biológica (Proudfoot et al., 2003). Incluso se han realizado investigaciones en el ámbito terapéutico con CKs incapaces de unir GAGs. Este es el caso de CCL5 con la zona de unión a GAGs mutada, como posible estrategia en el tratamiento crónico y agudo de daño hepático que representaría una alternativa a los antagonistas de las CKs (Nellen et al., 2012). La interferencia de la unión de CKs a GAGs es una posible vía terapéutica (Proudfoot, 2006). Todos estos ejemplos nos muestran que para la actividad biológica de las CKs es imprescindible la interacción con GAGs y que la unión les permite la formación del gradiente quimiotáctico y la asociación entre ellas para una señalización celular apropiada.

A pesar de que las vCKBPs se conocen desde hace muchos años, el trabajo presentado en esta tesis es la primera demostración formal de que una vCKBP que interactúa con el sitio de unión a GAGs en las CKs es capaz de prevenir la interacción de CKs con la superficie celular.

Las vCKBPs exhiben diferentes mecanismos de acción, así, M3 y 35-kDa tienen un amplio rango de unión, son poco selectivas, inhiben la unión de las CKs a su GPCR y no se unen a GAGs. Se ha descrito que M3 es dimérica, que además inhibir la quimiotaxis celular *in vitro* también es capaz de evitar la unión de las CKs a una superficie celular a través de GAGs, este hecho se entiende ya que muchas CKs comparten residuos en la interacción con GAGs y su GPCR (Laguri et al., 2008), M3 interactúa con las CK por el

loop-N de las CKs que puede incluir residuos de interacción a GAGs en algunas CKs (Webb et al., 2004). La proteína 35-kDa inhibe la quimiotaxis celular *in vitro* evitando la asociación CK-GPCR pero no se había descrito con anterioridad que también es capaz de evitar la interacción de las CKs con los GAGs (Fig. 27). Otra diferencia entre los mecanismos de acción de distintas vCKBPs es la selectividad de ligando, mientras que E163 es que tiene un rango de unión más estrecho, M3 y 35-kDa tienen un rango de selectividad de ligando mucho más amplio. Quizá, otro rasgo diferenciador entre ellas, la unión a GAGs o no, sea lo que determine su selectividad. Es decir, necesitan unir más CK para ejercer su función inhibitoria mientras que E163 al quedar anclada en la superficie celular puede ser más selectiva y actuar de un modo más local. Otros factores como la duplicación génica y el nivel de expresión de cada vCKBP durante la infección podrían estar relacionadas con el mecanismo de acción de éstas. El alto grado de especialización existente en los diferentes mecanismos de acción de las vCKBPs pone de manifiesto que los virus han desarrollado estrategias no redundantes funcionalmente en la modulación del sistema inmune de su hospedador.

5.3 Papel de 35-kDa de ECTV en *mousepox*

Para llegar a conocer el posible papel inmunomodulador de la proteína 35-kDa, nosotros hemos realizado un experimento *in vivo* utilizando el modelo de *mousepox* con un virus mutante que no expresaba la vCKBP (Fig. 52A-C). En ratones BALB/c e infección FP, observamos que el virus mutante mostró una gran atenuación comparado con ECTV ($DL_{50} > 10^4$ ufp). Además, la inflamación de la pata era mucho mayor que con el virus parental (Fig. 52D). Sin embargo, al realizar la secuenciación del genoma completo del virus mutante, detectamos una mutación puntual en el gen *EVN003* (Fig. 54). Este gen codifica la proteína p105bp que inhibe la acción de NF κ B (Mohamed et al., 2009). En un trabajo reciente, se demuestra que la infección con un ECTV mutante que no expresa el gen *EVN003* de ECTV está atenuado en una infección con animales BALB/c, no siendo letal ni con 10^5 ufp/animal (Rubio et al., 2013). Por este motivo no pudimos atribuir los resultados obtenidos solamente a la falta de expresión de 35-kDa.

5.4 Papel de la A41 en la infección con VACV

Trabajos previos se han realizado con el ortólogo de E163 en VACV, A41, (Ng et al., 2001), construyeron un virus mutante delecionado en el gen *A41* de VACV-WR, la cepa más virulenta de VACV, con infección IN (10^4 ufp/animal) en animales BALB/c, y no encontraron diferencias significativas en peso, síntomas de enfermedad ni en supervivencia. Realizaron también una infección intradermal en la oreja y encontraron un diámetro de lesión mayor en los animales infectados con el virus mutante de 6-11 dpi comparado con VACV. Se detectó un mayor título viral en el virus parental a 10-12 dpi. En infección subcutánea, se observó por inmunohistoquímica de la oreja a 3 dpi una mayor infiltración de leucocitos (CD43+) y menor cantidad del antígeno viral A27 en infecciones con el virus mutante comparado con el parental. Los autores concluyen que el virus delecionado en A41 es algo más virulento al provocar un mayor daño tisular debido a un incremento en la infiltración de leucocitos. Además el organismo elimina al virus mutante más rápidamente que a VACV. Un estudio posterior en 2006 (Clark et al., 2006), utilizó el mismo virus, VACV-WR delecionado en A41, con una menor dosis de infección (10^3 ufp/ratón), describe una mayor pérdida de peso a 7 dpi en los animales infectados con el virus mutante como dato significativo y menciona un aumento

en los síntomas de enfermedad, pero no hay diferencias significativas. Los autores concluyen que A41 no afecta a la replicación ni a la dispersión viral, al no encontrar diferencias en el título viral en bazo ni pulmón. Un análisis de la población de leucocitos en el bazo, por *ICS* a 6 y 9 dpi, mostró un aumento de LT CD8+ IFN γ + en infecciones con el virus mutante a 9 dpi, que fue confirmado por *ELISPOT* y en ensayos de citotoxicidad por liberación de ^{51}Cr . Todos estos resultados les hacen concluir que hay una mayor respuesta de LT CD8+ IFN γ + en el bazo a 9 dpi, en infecciones con el virus mutante, comparado con el parental. Por otro lado, construyen un virus recombinante delecionado en A41 de VACV MVA, cepa atenuada y empleada en vacunación. A los 42 dpi, tras la inmunización, analizaron el bazo detectando por *ELISPOT* e *ICS* la mayor presencia de LT CD8+ IFN γ + y LT CD8+ TNF α + en los animales vacunados con el virus mutante comparado con el parental. Para probar la eficacia de este virus como vacuna a los 28 dpi tras la vacunación infectaron con VACV WR y observaron una menor pérdida de peso (a los ratones vacunados con VACV MVA tuvieron que sacrificarlos) y sintomatología (significativo a 7 dpi) en los animales previamente vacunados con el virus mutante, comparada con los animales vacunados con VACV MVA. Las conclusiones de este trabajo son que el virus delecionado en A41 es más virulento y que este hecho se revela en las dosis de infección menores y que por ello no lo detectaron (Ng et al., 2001). Además, proponen que el aumento de virulencia estaría causado, en parte, por la respuesta de LTc más fuerte detectada en el bazo. También demuestran que la respuesta de LT CD8+ memoria es mejor con VACV-MVA- Δ A41, es decir, es una vacuna más efectiva. Otro grupo ha obtenido resultados en el mismo sentido, generaron un VACV MVA delecionado en los genes *A41L* y *B16R* (IL-1 β R) y han comprobado que induce una mejor respuesta adaptativa y memoria frente a la infección con VIH-1 (García-Arriaza et al., 2010).

5.5 Papel inmunomodulador de E163 en la infección por ECTV

ECTV tiene como único hospedador natural al ratón y ha existido una co-evolución virus-huésped que le convierte en un modelo muy apropiado para investigar la función de proteínas inmunomoduladoras, como es el caso de E163. Es por ello que elegimos profundizar en el papel de E163 en el modelo de *mousepox*.

5.5.1 Supervivencia, síntomas de enfermedad y pérdida peso en BALB/c

En un primer experimento realizado en la cepa BALB/c hemos visto que en la menor de las dosis (10 ufp/animal) encontramos que ECTV Δ E163 era más virulento que el virus parental porque los animales morían con más celeridad (TMM 10,4 d frente a 12,6 d en el parental), mayor número de muertes totales, mayor grado de síntomas de enfermedad aunque sólo significativas las diferencias a 8 dpi. La pérdida de peso fue también más acusada a 4 dpi (Fig. 36B). En un segundo experimento encontramos que en la menor de las dosis (1 ufp/animal) el virus mutante era nuevamente más virulento, los síntomas de enfermedad se acusan antes en el tiempo, el TMM era de 13 d para ECTV Δ E163 frente a 17,3 d en el parental, observamos mayores síntomas de enfermedad de 8-11 dpi y pérdidas de peso más acusadas de 7-9 dpi comparado con ECTV (Fig. 37A). Realizamos un último experimento con 10 animales/dosis y encontramos que en la menor de las dosis (0,1 ufp/animal) ECTV Δ E163 volvió a comportarse con mayor virulencia, los síntomas

de enfermedad son perceptibles antes en el tiempo, el TMM es de 17,7 d en el mutante frente a 20,2 en el parental, hay síntomas de enfermedad mayores y de un modo significativo de 15-17 dpi comparado con ECTV (Fig. 42). En este último experimento además, también son más acusados los síntomas de la enfermedad en la dosis de 1 ufp/animal de 12-14 dpi en el virus mutante (Fig. 42). Todos estos datos reiterados hasta en 3 ocasiones independientes, nos indican que la delección del gen *E163* de ECTV conlleva a un aumento de la virulencia.

Realizamos un experimento de transmisión y observamos que ECTV es transmisible desde animales infectados a partir de 4 dpi, es decir, en los grupos de exposición G2 (4-7 dpi) y G3 (6-9 dpi) (Figs. 44 y 45). No encontramos deficiencia en la transmisión de la enfermedad al comparar animales infectados con ECTVΔE163 frente al virus parental (Fig. 45) por lo que concluimos que E163 no está implicada en la transmisión viral aunque nuevamente encontramos una mayor tendencia a morir antes con el virus ECTVΔE163 (TMM= 16,5 y 12) comparada con ECTV (TMM=17 y 12,3).

En ratones Balb/c infectados con mayores dosis de virus no hemos encontrado diferencias entre las dos infecciones o cuando ha habido un mayor TMM para el virus mutante, nunca ha sido con una diferencia superior a 2 d (Fig. 42, 1 y 10 ufp). Sin embargo, hemos observado síntomas más acusados de enfermedad o pérdida de peso, máximo 2 d, en la infección con ECTV frente al mutante (Fig. 37A, 10 y 10², 10³ ufp). En dosis 10 ufp, en el tercer experimento, observamos 3 d no consecutivos de síntomas mayores también en la infección con el virus parental frente al delecionado (Fig. 42). Lo que estos resultados parecen indicar es que la función de la proteína E163 se enmascara cuando aumentamos la dosis de infección y no hay una tendencia clara o consistente en ellos.

La DL_{50} para ambos virus en esta cepa sería < 0,1 ufp pero debemos de tener en cuenta que no podemos descartar posibles re-infecciones entre los animales, y que por lo tanto la DL_{50} podría ser algo superior (Tablas 9 y 10). Con todo ello podemos afirmar que ECTVΔE163 es más virulento que ECTV en la cepa Balb/c a las dosis de infección más bajas, conclusión que es consistente con otros trabajos publicados anteriormente (Clark et al., 2006; Ng et al., 2001).

5.5.2 Supervivencia, síntomas de enfermedad y pérdida peso en ratones B6

En la presente tesis también hemos investigado el papel de la proteína E163 de ECTV en ratones resistentes, B6, infectados por otra vía de infección, la IN. En nuestro primer experimento hemos encontrado que en 3 (10⁴, 10⁵ y 10⁶ ufp) de las 4 dosis de infección empleadas, ECTVΔE163 es más virulento que el parental. En 10⁴ ufp, se observa diferencia en el TMM (ECTVΔE163: 9,3 d; ECTV: 10,5) y en la DL_{50} (ECTVΔE163: 10³-10⁴ ufp, ECTV: 10⁴-10⁵ ufp), y hay un mayor número de muertes totales y una mayor tendencia, aunque no significativa, a perder más peso en infecciones con el virus mutante (Fig. 38). En 10⁵ ufp, el TMM de ECTVΔE163 es de 8,2 d frente a 10,2 para ECTV y hay mayor tendencia a la pérdida de peso en el mutante (Fig. 38). En 10⁶ ufp hay mayores síntomas de enfermedad de un modo significativo a 6 dpi (Fig. 38). De nuevo encontramos más virulencia en el virus delecionado comparado con ECTV.

En el segundo experimento utilizamos 10 animales por dosis de infección y observamos nuevamente que en la dosis de 10³ ufp con el virus mutante hay un incremento significativo de síntomas de enfermedad (7-

9 y 15-16 dpi), y una mayor tendencia a la pérdida de peso (Fig. 43). En 10^5 ufp, el TMM es menor en ECTV Δ E163 (8,4 d) frente a ECTV (9,4 d) y hay un aumento significativo de síntomas de enfermedad con el virus mutante (5, 7 y 17 dpi) (Fig. 43).

Sin embargo, en esta cepa hay ciertas contradicciones o el papel de E163 se encuentra algo más enmascarado porque en el primer experimento hemos visto que en la menor de las dosis, 10^3 ufp, hay mayores síntomas de enfermedad los d 8, 10-14 post-infección y mayores pérdidas de peso de 8-14 dpi, en el virus parental comparado con el mutante (Fig. 38). En el segundo experimento hay solamente un día, 6 dpi, en la dosis de 10^3 ufp, en el cuál son mayores los síntomas de enfermedad en el parental (Fig. 43). Sin embargo, en la dosis de 10^4 ufp, el TMM (9,9 d para ECTV y 10,8 d para ECTV Δ E163), los síntomas de enfermedad (5-6, 8 y 17 dpi) y la pérdida de peso (8-9 y 11 dpi) parecen indicar más virulencia en ECTV (Fig. 43). Es como si la dosis 10^3 ufp del experimento anterior (Fig. 38), se correspondiera con la dosis de 10^4 ufp del presente.

En resumen, el virus mutante delecionado en el gen *E163* es más virulento en ratones B6 infectados con 10^5 ufp y parece que podría detectarse este hecho también en las dosis de 10^3 y 10^4 ufp.

5.6 Análisis celular en la infección con ECTV Δ E163 y ECTV

Las CKs que une con alta afinidad E163 son CXCL12 α , CXCL12 β , CXCL13, CXCL14, CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27 y CCL28, aunque también une con menor afinidad CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Los CKR específicos de estas CKs y las células diana de las mismas se describen esquemáticamente en la Tabla 14.

Algunas de las funciones de estas CKs son regular el tráfico de LTc, células NK y la respuesta Th1 (CXCL9, CXCL10 y CXCL11), la homeostasis de la médula ósea y tráfico de neutrófilos (CXCL12), la arquitectura y tráfico de linfocitos T-B en el nódulo linfático (CXCL13), la migración de monocitos y CDs a tejidos periféricos, y la migración de macrófagos en la piel (CXCL14), la homeostasis de LT y CDs en el nódulo linfático, y la migración de CDs a vasos aferentes linfáticos (CCL21), la migración de eosinófilos y basófilos hacia tejidos periféricos, y la atracción de Th2 (CCL24, CCL26), la homeostasis de LT en superficies mucosas, la migración y desarrollo de timocitos (CCL25), la homeostasis y el reclutamiento de LT en la piel (CCL27), y la homeostasis de LT y células plasmáticas (IgA) en mucosas y glándulas salivares (CCL28) (Bachelier et al., 2014; Griffith et al., 2014; Zlotnik and Yoshie, 2012).

ECTV infecta mediante pequeñas heridas en la piel, en la epidermis, replica inicialmente y la progenie se expande a los nódulos linfáticos desde donde pasará al torrente sanguíneo y finalmente a otros órganos. En la epidermis, los queratinocitos y las CDs secretan citoquinas pro-inflamatorias (IL1 α/β , IL6, IL7, IL10, IL12, IL15, IL18, TNF α , INF α/β e INF γ), CKs y factores de crecimiento. Las citoquinas y las CKs de la epidermis pasan a la membrana basal y actúan en la dermis y el endotelio post-capilar. Las vénulas post-capilares son los mayores sitios de diapedesis de células inflamatorias (Esteban and Buller, 2005). Las CDs activan a los eosinófilos, macrófagos y las células NK con la secreción principalmente de INF γ . En los nódulos linfáticos, la activación de los LT y LB naïve, por parte de las CDs hace que se expandan y se

diferencien. Los LT activados pueden migrar hasta los tejidos infectados atravesando el epitelio inflamado. A su vez, los linfocitos colaboradores (Fig. 55) amplifican la señal secretando citoquinas. Los LTc lisan las células infectadas. Los LB que se activan tras su contacto con LT y CDs, migran a diferentes áreas donde maduran hasta células plasmáticas generando Ab neutralizantes contra el patógeno (Banchereau et al., 2000).

| CK | Receptor | Células que expresan el GPCR |
|--------|----------|--|
| CXCL9 | CXCR3 | Th1, LTc, CD plasmacitoides, LT CD8+ memoria, LT CD4+ reguladores, LT CD4+ foliculares, NK, LB |
| CXCL10 | | |
| CXCL11 | | |
| CXCL12 | CXCR4 | Leucocitos |
| | CXCR7 | LB |
| CXCL13 | CXCR5 | LB, LT CD4+ foliculares, LT CD8+ memoria |
| CXCL14 | ? | |
| CCL21 | CCR7 | CD migratorias y plasmacitoides; LB, LT CD8+ naïve y memoria; LT CD4+ naïve y reguladoras |
| CCL24 | CCR3 | Eosinófilos, basófilos y mastocitos |
| CCL26 | | |
| CCL25 | CCR9 | LT CD8+ naïve y memoria, timocitos, LB, CD y CD plasmacitoides |
| CCL27 | CCR10 | |
| CCL28 | CCR10 | Células plasmáticas |
| | CCR3 | Eosinófilos y basófilos |

Tabla 14. CKs, CKR y células diana. Información recopilada de Kouji Matsushima et al. 2012; (Griffith et al., 2014)

Es el ambiente de citoquinas circundante el principal motor de diferenciación de LT naïve hacia Th1 o Th2. Las hormonas influyen también en su diferenciación, los glucocorticoides, estrógenos y progestágenos favorecen el balance hacia Th2, mientras que los derivados de testosterona y las catecolaminas, lo hacen hacia Th1. Las células Th1 (IL2, IFN γ y linfotoxina- α) por medio de IFN γ activan la fagocitosis, la lisis oxidativa, la muerte celular por patógenos intracelulares y la sobre-expresión de MHC-I y MHC-II que aumenta la presentación antigénica a LT (Fig. 55). La linfotoxina- α activa a las células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y leucocitos. Todas estas células secretan citoquinas pro-inflamatorias como TNF y CKs, activando al endotelio, con la subsiguiente expresión de moléculas de adhesión y atrayendo al sistema inmune innato principalmente, a la zona infectada. Los linfocitos Th2 (IL4, IL5, IL9, IL10 e IL13) (Fig. 55) activan la proliferación de LB, la producción de Ab y el cambio de isotipo de IgG a IgE. Las células Th2 estimulan la generación de títulos muy altos de Ab, su respuesta se caracteriza por la presencia de IgE y procesos de inflamación protagonizados por eosinófilos, basófilos y, degranulación de mastocitos. Además, las IL10, IL4 e IL13 inhiben la fagocitosis y la lisis celular por patógenos intracelulares, inhiben las citoquinas inflamatorias y provocan anergia en LT. Las células Th2 (IL4+IFN γ -) mediante la secreción de IL4 e IL10 inhiben la producción de IL12 e IFN γ impidiendo la diferenciación hacia Th1 (IFN γ +IL4-), mientras que el IFN γ inhibe la producción de IL4 impidiendo la diferenciación hacia Th2. La IL4 tiene un efecto dominante sobre la IL12 (Spellberg and Edwards, 2001).

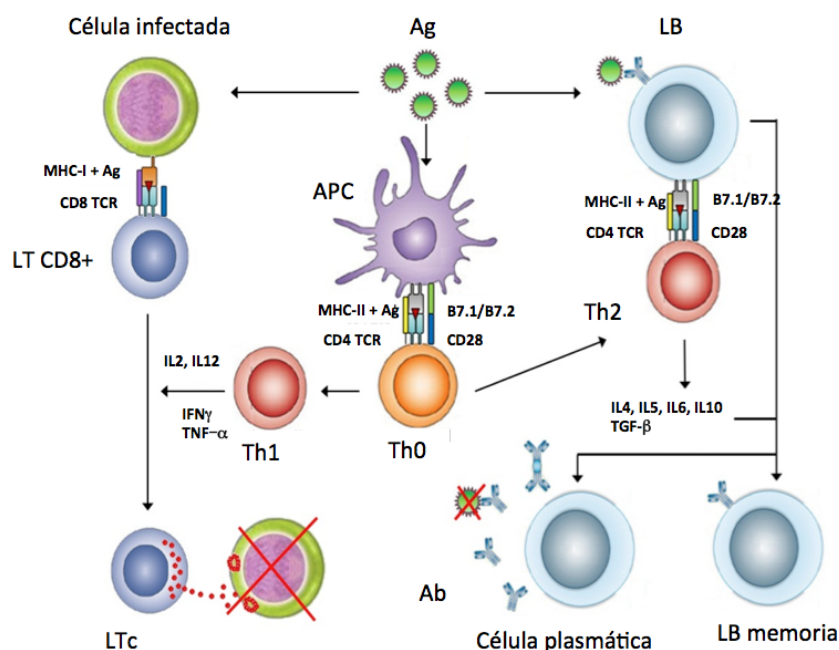


Fig. 55. Respuesta inmune adaptativa frente a infección viral. Las APCs interaccionan con LB y LT. Las células infectadas presentan péptidos antigénicos en el marco de MHC-I a LT CD8+. Estas se activan y se diferencian hasta LTc que lisarán las células infectadas por medio de Gz y perforinas. La población Th1 secreta IL2, IFN γ y TNF α que resulta en la activación de LT CD8+ hasta LTc memoria. Las células Th2 (secretan IL4, IL5, IL6, IL10) activan a los LB naïve e inducen la diferenciación hasta células memoria y plasmáticas secretoras de IgG, IgA e IgE. Figura adaptada de *De Haes, et al., 2012*.

5.6.1 Análisis celular en BALB/c infectados con ECTV

Para averiguar el papel inmunomodulador de la proteína E163 infectamos animales susceptibles y resistentes a la enfermedad con ECTV. En nuestros experimentos hemos observado un aumento de la virulencia en el virus mutante frente al parental, pero al analizar la replicación y diseminación viral en el organismo a 2 y 5 dpi, en pata, bazo e hígado, no detectamos diferencias significativas el título viral (ufp/g) entre las dos infecciones (Fig. 46A).

Por último, realizamos un experimento para investigar si el aumento de la virulencia era debido a una inmunopatología o respuesta exacerbada del sistema inmunitario. Para ello analizamos 3 grupos de 4 animales por cada infección, para analizar la infiltración celular a 2 dpi en el ganglio poplíteo. Las poblaciones analizadas han sido CDs maduras, LTc, células NK, LT CD4+ y linfocitos Th2.

En BALB/c, encontramos diferencias significativas en el porcentaje de la población Th2 (CD4+IL4+), siendo mayor en los órganos procedentes de la infección con ECTV Δ E163 comparado con ECTV (Fig. 47A). Además, también hay un aumento significativo en los LTc (CD3+CD8+GzB+) activados en el virus mutante respecto del parental (Fig. 49A). El aumento en la población de LTc activados (en ausencia de la expresión de E163) concuerda con los resultados descritos por otros laboratorios en la infección con el virus VACV Δ A41 (Clark et al., 2006) y también con el aumento de leucocitos que relatan en la infección con el mismo virus, en otro trabajo publicado anteriormente (Ng et al., 2001). Al igual que nosotros, tampoco detectan diferencias en la replicación viral al comparar VACV Δ A41 con VACV (Clark et al., 2006). Por otro lado, en un trabajo más reciente, en el que planteaban la hipótesis inicial de que interfiriendo la vía de la respuesta Th2 conseguirían observar un balance hacia la respuesta Th1 en animales BALB/c infectados con ECTV, observaron que esto no era así (Sakala et al., 2015). Es más, demostraron que la deficiencia en la vía de la respuesta Th2 (IL4/IL13/STAT6) provocaba una mayor susceptibilidad en los animales, frente

a la infección con ECTV o con ECTV Δ IFN γ BP. Es interesante que en este trabajo señalan una relación directa entre la deficiencia en la respuesta Th2 y la disminución de la actividad de LTc, pero además, también citan una reducción en LT CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} . Afirman que IL4, IL6 y STAT6 tienen funciones muy importantes y no redundantes en la generación de una respuesta óptima de LTc. Es decir, la respuesta Th2 es importante en la susceptibilidad frente a ECTV y hay una relación directa y positiva entre ella, los LTc y LT CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} , poniendo de relieve que la respuesta frente a ECTV es más compleja que el balance Th1/Th2 (Sakala et al., 2015). En esta misma línea, nuestros resultados vuelven a encajar con lo publicado previamente, el aumento en Th2 en BALB/c, va acompañado de un aumento de LTc (Figs. 47A y 49B). Pero nosotros añadimos un dato más en el rompecabezas, la proteína E163 actúa modulando la respuesta de linfocitos Th2 en etapas tempranas de la infección (2 dpi), demostrando que tiene un papel relevante en la modulación del sistema inmunitario del hospedador y en la patogénesis viral. Es una proteína conservada en todos los poxvirus y parece tener una relación directa en la inhibición de la respuesta Th2 y, directa o indirectamente, en la de los LTc. En Sakala, et al., 2015, observaron que la ausencia total de la respuesta Th2 lleva a un aumento de la susceptibilidad del ratón. Nosotros vemos que el aumento excesivo de la respuesta Th2 provoca un mayor daño en el ratón que provoca una muerte más temprana. Probablemente, pueda darse una situación semejante a la hipersensibilidad de tipo I donde existe una inflamación con Th2, eosinófilos, basófilos, mastocitos, neutrófilos y células plasmáticas secretoras de IgE. En un escenario con degranulación de gránulos citoplásmicos, citoquinas, CKs y aminos vasoactivas (Giuri, 1998; Rowe and Gill, 2015). Además, añadiendo el aumento de citotoxicidad mediada por LTc (CD8 $^{+}$ GzB $^{+}$). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en células NK, ni en CDs maduras, ni en la población total de LT CD4 $^{+}$ (Figs. 47A, 48A, 49A y 50A). En una primera aproximación dónde analizamos células NK y LT CD8 $^{+}$ GzB $^{+}$ se reiteró el aumento de LTc en el ganglio poplíteo de los animales infectados con ECTV Δ E163 frente a los infectados con ECTV, a 2 dpi (Fig. 39A).

5.6.2 Análisis de leucocitos en B6 infectados con ECTV

En la replicación viral o dispersión de ambos virus, ECTV y ECTV Δ E163, no hubo diferencias a 2 ni a 5 dpi en los órganos analizados (bazo, hígado y pulmón) (Fig. 46B). En los ratones B6, al analizar las mismas poblaciones descritas para BALB/c, encontramos que hay nuevamente mayor respuesta Th2 en el virus mutante comparado con ECTV (Fig. 47B). Sin embargo, en este caso, la presencia de E163 favorece la respuesta de LTc, es decir, en la infección con ECTV hay mayor porcentaje de estas células, que en el virus deletado (Fig. 49B). La cepa B6 tiene una mayor respuesta de tipo 1, que está correlacionada con una activación más robusta de LTc y células NK, que es lo que se les atribuye para explicar su resistencia frente a *mousepox* (Chaudhri et al., 2004). En una base genética en la que está favorecida la respuesta hacia Th1, si la proteína E163 inhibe la respuesta de tipo Th2 como hemos visto, estará favoreciendo el balance hacia la diferenciación de linfocitos Th1. Con ello, el IFN γ podría estar activando la respuesta de LTc y de células NK, entre otras. Esta sería una explicación plausible de la mayor resistencia que hemos encontrado en la infección con ECTV frente a la mayor susceptibilidad observada en los animales infectados con ECTV Δ E163 (Figs. 38 y 43). Independientemente, en ausencia de E163, hay mayor respuesta de linfocitos

Th2, que podrían estar provocando los síntomas de mayor enfermedad y menor TMM que hemos observado en nuestros experimentos. Si bien es cierto, que al no ir acompañado de una mayor acción de LTc, no ha sido tan evidente la inmunopatología, como en el caso de los experimentos realizados en BALB/c.

En ratones B6 tampoco encontramos diferencias significativas a 2 dpi entre las poblaciones de células NK, CDs maduras o el número total de LT CD4+ ni LT CD8+ al comparar ambas infecciones (ECTVΔE163 frente a ECTV) (Figs. 47B, 48B, 49B y 50B).

Otra de las cuestiones que hemos abordado en esta tesis es la función de E163 en la respuesta memoria de LT CD8+. En trabajos anteriores, se ha demostrado que la ausencia de la expresión de A41 en VACV mejoraba la respuesta inmune en la vacunación (Clark et al., 2006; Garcia-Arriaza et al., 2010). Estos resultados también pueden estar basados en el aumento en la respuesta Th2 que favorece la generación de Ab. La respuesta de tipo 2 que secreta IL4, estimula el cambio de isotipo desde IgM hacia IgG2, IgG4 e IgE, activa la respuesta humoral e inhibe la celular, y los títulos de Ab son mayores que los que se generan en la respuesta de tipo 1 (Spellberg and Edwards, 2001). Hemos analizado la activación de LT CD8+ memoria (CD8+IFN γ +) a 4 dpi en el bazo, con animales previamente inmunizados con ECTV o con ECTVΔE163, pero tras la activación de los hepatocitos *ex vivo* con los péptidos B8R, A6L y B2R, no observamos diferencias significativas entre la infección con ambos virus (Fig. 40). Quizá el fondo genético u otras variables que no controlamos sean responsables de la falta de observación de dicha diferencia en este modelo experimental.

6. CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Se han identificado las regiones de unión a GAGs en la proteína E163: ¹⁵²LKPRDFKT¹⁵⁹ (B), ¹⁴¹KTKDFMK¹⁴⁷ (A) y ²¹³RKILKKKF²²⁰ (C). La región B es esencial para la interacción de E163 con la célula y la pérdida de unión de E163 a la célula requiere la mutación simultánea de una región adicional de unión a GAGs, C o A.
2. Las regiones de unión a CKs y GAGs en E163, no son totalmente independientes. Las proteínas variantes E163-1 a E163-5 siguen uniendo CKs aunque se ve alterada su afinidad de unión a CKs. Las regiones B y C son las que afectan más a la pérdida de afinidad.
3. La proteína E163 es capaz de formar oligómeros.
4. Como parte de su mecanismo de acción, las proteínas 35-kDa de ECTV, 35-kDa de CPXV-BR y 35-kDa de CPXV-Cheetah son capaces de inhibir la interacción mediada por GAGs de una CK a una superficie celular. La proteína 35-kDa de ECTV no interacciona con GAGs. La acción inmonomoduladora de 35-kDa evita la interacción entre la CK y su GPCR, y además la formación del gradiente quimiotáctico necesario para su función *in vivo*.
5. La proteína E163 de ECTV es dispensable para la replicación del virus en cultivos celulares, no afectando a la formación de las placas de lisis ni a la dispersión viral *in vitro*. El mutante de delección ECTVΔE163 es capaz de replicar en tejidos de ratones infectados. La ausencia de expresión de E163 no afecta a la transmisión de ECTV entre ratones Balb/c.
6. ECTVΔE163 es más virulento que ECTV atendiendo al tiempo medio de muerte, síntomas de enfermedad y pérdida de peso, en dosis de infección bajas (0,1, 1 y 10 ufp) en BALB/c infectados por la ruta FP. El aumento de virulencia en el virus mutante se observa también en ratones C57BL/6 aunque de un modo menos obvio en dosis próximas a la DL₅₀, de 10³-10⁶ ufp. Podemos afirmar que E163 influye en la patogénesis de ECTV.
7. E163 inhibe a tiempos tempranos de la infección con ECTV la migración de la población de células Th2, hacia los ganglios poplíteos en BALB/c y hacia los ganglios cervicales superiores en C57BL/6.
8. En un fondo genético de ratones Balb/c, balanceado hacia una respuesta Th2, la proteína E163 actúa indirectamente sobre la población de LTc tras la infección FP con ECTV, inhibiendo su migración hacia el

ganglio poplíteo. Sin embargo, en un fondo genético de ratones C57BL/6, con una respuesta Th1 predominante, la proteína E163 favorece la presencia de un mayor porcentaje de LTc en los ganglios cervicales superiores tras una infección IN con ECTV.

9. La vCKBP E163 no afecta a las poblaciones de células NK o CD8 maduras, al porcentaje total de LT CD4+ ni tampoco al de LT CD8+ en infecciones de animales BALB/c o C57BL/6, en los ganglios poplíteos o cervicales superiores, respectivamente.

10. La proteína E163 tiene su acción inmunomoduladora evitando la interacción de las CKs con GAGs. Sin embargo, el complejo E163-CK permanece anclado a la superficie celular, debido a la interacción de E163 con los GAGs celulares, y proponemos que de esta forma E163 evita la configuración espacial necesaria para la transducción de señales de las CKs a través de su receptor específico y su función *in vivo*. De acuerdo con este modelo, E163 interrumpe tanto la formación del gradiente de CKs en la superficie celular como la transducción de señales a través del GPCR cuando las CKs se presentan desde una superficie celular.

7. BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

- Alcami, A., 2003. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol* 3, 36-50.
- Alcami, A., Khanna, A., Paul, N.L., Smith, G.L., 1999. Vaccinia virus strains Lister, USSR and Evans express soluble and cell-surface tumour necrosis factor receptors. *The Journal of general virology* 80 (Pt 4), 949-959.
- Alcami, A., Smith, G.L., 1992. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71, 153-167.
- Alcami, A., Smith, G.L., 1995. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *Journal of virology* 69, 4633-4639.
- Alcami, A., Smith, G.L., 1996. Soluble interferon-gamma receptors encoded by poxviruses. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 19, 305-317.
- Alcami, A., Symons, J.A., Collins, P.D., Williams, T.J., Smith, G.L., 1998. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J Immunol* 160, 624-633.
- Alcami, A., Symons, J.A., Smith, G.L., 2000. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *Journal of virology* 74, 11230-11239.
- Alejo, A., Ruiz-Arguello, M.B., Ho, Y., Smith, V.P., Saraiva, M., Alcami, A., 2006. A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5995-6000.
- Alejo, A., Saraiva, M., Ruiz-Arguello, M.B., Viejo-Borbolla, A., de Marco, M.F., Salguero, F.J., Alcami, A., 2009. A method for the generation of ectromelia virus (ECTV) recombinants: in vivo analysis of ECTV vCD30 deletion mutants. *PLoS One* 4, e5175.
- Alexander, J.M., Nelson, C.A., van Berkel, V., Lau, E.K., Studts, J.M., Brett, T.J., Speck, S.H., Handel, T.M., Virgin, H.W., Fremont, D.H., 2002. Structural basis of chemokine sequestration by a herpesvirus decoy receptor. *Cell* 111, 343-356.
- Ali, S., Palmer, A.C., Banerjee, B., Fritchley, S.J., Kirby, J.A., 2000. Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans. *The Journal of biological chemistry* 275, 11721-11727.
- Alzhanova, D., Fruh, K., 2010. Modulation of the host immune response by cowpox virus. *Microbes Infect* 12, 900-909.
- Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., Magerus, A., Thelen, M., Montes, M., Virelizier, J.L., Delepierre, M., Baleux, F., Lortat-Jacob, H., Arenzana-Seisdedos, F., 1999. Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *The Journal of biological chemistry* 274, 23916-23925.

Andrewes, C.H., Elford, W.J., 1947. Infections ectromelia; experiments on interference and immunization. *British journal of experimental pathology* 28, 278-285.

Antonets, D.V., Nepomnyashchikh, T.S., Shchelkunov, S.N., 2010. SECRET domain of variola virus CrmB protein can be a member of poxviral type II chemokine-binding proteins family. *BMC Res Notes* 3, 271.

Arnold, P.L., Fremont, D.H., 2006. Structural determinants of chemokine binding by an Ectromelia virus-encoded decoy receptor. *Journal of virology* 80, 7439-7449.

Babkin, I.V., Babkina, I.N., 2015. The origin of the variola virus. *Viruses* 7, 1100-1112.

Bachelierie, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A.M., Combadiere, C., Farber, J.M., Graham, G.J., Horuk, R., Sparre-Ulrich, A.H., Locati, M., Luster, A.D., Mantovani, A., Matsushima, K., Murphy, P.M., Nibbs, R., Nomiya, H., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Rosenkilde, M.M., Rot, A., Sozzani, S., Thelen, M., Yoshie, O., Zlotnik, A., 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 66, 1-79.

Bahar, M.W., Kenyon, J.C., Putz, M.M., Abrescia, N.G., Pease, J.E., Wise, E.L., Stuart, D.I., Smith, G.L., Grimes, J.M., 2008. Structure and function of A41, a vaccinia virus chemokine binding protein. *PLoS pathogens* 4, e5.

Balan, P., Davis-Poynter, N., Bell, S., Atkinson, H., Browne, H., Minson, T., 1994. An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *The Journal of general virology* 75 (Pt 6), 1245-1258.

Baltus, T., Weber, K.S., Johnson, Z., Proudfoot, A.E., Weber, C., 2003. Oligomerization of RANTES is required for CCR1-mediated arrest but not CCR5-mediated transmigration of leukocytes on inflamed endothelium. *Blood* 102, 1985-1988.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Baroudy, B.M., Moss, B., 1982. Sequence homologies of diverse length tandem repetitions near ends of vaccinia virus genome suggest unequal crossing over. *Nucleic acids research* 10, 5673-5679.

Bartee, M.Y., Chen, H., Dai, E., Liu, L.Y., Davids, J.A., Lucas, A., 2013. Defining the anti-inflammatory activity of a potent myxomaviral chemokine modulating protein, M-T7, through site directed mutagenesis. *Cytokine* 65, 79-87.

Baxby, D., 1981. An unauthorized contemporary reprinting of Jenner's paper on the cuckoo. *Journal of the history of medicine and allied sciences* 36, 218-219.

Beall, C.J., Mahajan, S., Kuhn, D.E., Kolattukudy, P.E., 1996. Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity. *Biochem J* 313 (Pt 2), 633-640.

- Beck, C.G., Studer, C., Zuber, J.F., Demange, B.J., Manning, U., Urfer, R., 2001. The viral CC chemokine-binding protein vCCI inhibits monocyte chemoattractant protein-1 activity by masking its CCR2B-binding site. *The Journal of biological chemistry* 276, 43270-43276.
- Blanpain, C., Doranz, B.J., Bondue, A., Govaerts, C., De Leener, A., Vassart, G., Doms, R.W., Proudfoot, A., Parmentier, M., 2003. The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle. *The Journal of biological chemistry* 278, 5179-5187.
- Born, T.L., Morrison, L.A., Esteban, D.J., VandenBos, T., Thebeau, L.G., Chen, N., Spriggs, M.K., Sims, J.E., Buller, R.M., 2000. A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *Journal of immunology* 164, 3246-3254.
- Bridgeman, A., Stevenson, P.G., Simas, J.P., Efstathiou, S., 2001. A secreted chemokine binding protein encoded by murine gammaherpesvirus-68 is necessary for the establishment of a normal latent load. *The Journal of experimental medicine* 194, 301-312.
- Brownstein, D.G., Gras, L., 1997. Differential pathogenesis of lethal mousepox in congenic DBA/2 mice implicates natural killer cell receptor NKR-P1 in necrotizing hepatitis and the fifth component of complement in recruitment of circulating leukocytes to spleen. *Am J Pathol* 150, 1407-1420.
- Bryant, N.A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., Alcamí, A., 2003. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *Embo J* 22, 833-846.
- Buatois, V., Fagete, S., Magistrelli, G., Chatel, L., Fischer, N., Kosco-Vilbois, M.H., Ferlin, W.G., 2010. Pan-CC chemokine neutralization restricts splenocyte egress and reduces inflammation in a model of arthritis. *J Immunol* 185, 2544-2554.
- Buller, R.M., Owens, G., Schriewer, J., Melman, L., Beadle, J.R., Hostetler, K.Y., 2004. Efficacy of oral active ether lipid analogs of cidofovir in a lethal mousepox model. *Virology* 318, 474-481.
- Buller, R.M., Palumbo, G.J., 1991. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* 55, 80-122.
- Burns, J.M., Dairaghi, D.J., Deitz, M., Tsang, M., Schall, T.J., 2002. Comprehensive mapping of poxvirus vCCI chemokine-binding protein. Expanded range of ligand interactions and unusual dissociation kinetics. *The Journal of biological chemistry* 277, 2785-2789.
- Bursill, C.A., McNeill, E., Wang, L., Hibbitt, O.C., Wade-Martins, R., Paterson, D.J., Greaves, D.R., Channon, K.M., 2009. Lentiviral gene transfer to reduce atherosclerosis progression by long-term CC-chemokine inhibition. *Gene Ther* 16, 93-102.
- Cabrera, J.R., Viejo-Borbolla, A., Martinez-Martin, N., Blanco, S., Wandosell, F., Alcamí, A., 2015. Secreted herpes simplex virus-2 glycoprotein G modifies NGF-TrkA signaling to attract free nerve endings to the site of infection. *PLoS pathogens* 11, e1004571.
- Cardin, A.D., Weintraub, H.J., 1989. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9, 21-32.

Carfi, A., Smith, C.A., Smolak, P.J., McGrew, J., Wiley, D.C., 1999. Structure of a soluble secreted chemokine inhibitor vCCI (p35) from cowpox virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12379-12383.

Carter, G.C., Rodger, G., Murphy, B.J., Law, M., Krauss, O., Hollinshead, M., Smith, G.L., 2003. Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *The Journal of general virology* 84, 2443-2458.

Chang, S.J., Hsiao, J.C., Sonnberg, S., Chiang, C.T., Yang, M.H., Tzou, D.L., Mercer, A.A., Chang, W., 2009. Poxvirus host range protein CP77 contains an F-box-like domain that is necessary to suppress NF-kappaB activation by tumor necrosis factor alpha but is independent of its host range function. *Journal of virology* 83, 4140-4152.

Chantrey, J., Meyer, H., Baxby, D., Begon, M., Bown, K.J., Hazel, S.M., Jones, T., Montgomery, W.I., Bennett, M., 1999. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiology and infection* 122, 455-460.

Chaudhri, G., Panchanathan, V., Bluethmann, H., Karupiah, G., 2006. Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. *Journal of virology* 80, 6339-6344.

Chaudhri, G., Panchanathan, V., Buller, R.M., van den Eertwegh, A.J., Claassen, E., Zhou, J., de Chazal, R., Laman, J.D., Karupiah, G., 2004. Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9057-9062.

Chen, N., Danila, M.I., Feng, Z., Buller, R.M., Wang, C., Han, X., Lefkowitz, E.J., Upton, C., 2003. The genomic sequence of ectromelia virus, the causative agent of mousepox. *Virology* 317, 165-186.

Clark, R.H., Kenyon, J.C., Bartlett, N.W., Tschärke, D.C., Smith, G.L., 2006. Deletion of gene A41L enhances vaccinia virus immunogenicity and vaccine efficacy. *The Journal of general virology* 87, 29-38.

Costes, B., Ruiz-Arguello, M.B., Bryant, N.A., Alcamí, A., Vanderplasschen, A., 2005. Both soluble and membrane-anchored forms of Felid herpesvirus 1 glycoprotein G function as a broad-spectrum chemokine-binding protein. *The Journal of general virology* 86, 3209-3214.

Cyrklaff, M., Risco, C., Fernandez, J.J., Jimenez, M.V., Esteban, M., Baumeister, W., Carrascosa, J.L., 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2772-2777.

Delano, M.L., Brownstein, D.G., 1995. Innate resistance to lethal mousepox is genetically linked to the NK gene complex on chromosome 6 and correlates with early restriction of virus replication by cells with an NK phenotype. *Journal of virology* 69, 5875-5877.

Deruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A.L., Dias, J.M., Coelho, F.M., Russo, R.C., Ferreira, B.R., Graham, G.J., Shaw, J.P., Wells, T.N., Teixeira, M.M., Power, C.A., Proudfoot, A.E., 2008. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *The Journal of experimental medicine* 205, 2019-2031.

- Dick, E.J., Jr., Kittell, C.L., Meyer, H., Farrar, P.L., Ropp, S.L., Esposito, J.J., Buller, R.M., Neubauer, H., Kang, Y.H., McKee, A.E., 1996. Mousepox outbreak in a laboratory mouse colony. *Laboratory animal science* 46, 602-611.
- Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L., Smith, G.L., 2010. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* 327, 873-876.
- Dyer, D.P., Thomson, J.M., Hermant, A., Jowitt, T.A., Handel, T.M., Proudfoot, A.E., Day, A.J., Milner, C.M., 2014. TSG-6 inhibits neutrophil migration via direct interaction with the chemokine CXCL8. *J Immunol* 192, 2177-2185.
- Essbauer, S., Pfeffer, M., Meyer, H., 2010. Zoonotic poxviruses. *Veterinary microbiology* 140, 229-236.
- Esteban, D.J., Buller, R.M., 2005. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. *The Journal of general virology* 86, 2645-2659.
- Esteban, D.J., Nuara, A.A., Buller, R.M., 2004. Interleukin-18 and glycosaminoglycan binding by a protein encoded by Variola virus. *The Journal of general virology* 85, 1291-1299.
- Esteban, M., 2009. Attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC as promising vaccine candidates against HIV/AIDS. *Human vaccines* 5, 867-871.
- Fang, M., Lanier, L.L., Sigal, L.J., 2008. A role for NKG2D in NK cell-mediated resistance to poxvirus disease. *PLoS pathogens* 4, e30.
- Fang, M., Orr, M.T., Spee, P., Egebjerg, T., Lanier, L.L., Sigal, L.J., 2011. CD94 is essential for NK cell-mediated resistance to a lethal viral disease. *Immunity* 34, 579-589.
- Fang, M., Siciliano, N.A., Hersperger, A.R., Roscoe, F., Hu, A., Ma, X., Shamsedeen, A.R., Eisenlohr, L.C., Sigal, L.J., 2012. Perforin-dependent CD4⁺ T-cell cytotoxicity contributes to control a murine poxvirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 9983-9988.
- Fang, M., Sigal, L.J., 2006. Direct CD28 costimulation is required for CD8⁺ T cell-mediated resistance to an acute viral disease in a natural host. *J Immunol* 177, 8027-8036.
- Fenner, F., 1981. Mousepox (infectious ectromelia): past, present, and future. *Lab Anim Sci* 31, 553-559.
- Fenner, F., 1993. Smallpox: emergence, global spread, and eradication. *History and philosophy of the life sciences* 15, 397-420.
- Fernandez de Marco Mdel, M., Alejo, A., Hudson, P., Damon, I.K., Alcamí, A., 2010. The highly virulent variola and monkeypox viruses express secreted inhibitors of type I interferon. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 1479-1488.
- Fernandez, E.J., Lolis, E., 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 469-499.
- Filee, J., 2009. Lateral gene transfer, lineage-specific gene expansion and the evolution of Nucleo Cytoplasmic Large DNA viruses. *Journal of invertebrate pathology* 101, 169-171.

Finlay, B.B., McFadden, G., 2006. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 124, 767-782.

Frauensschuh, A., Power, C.A., Deruaz, M., Ferreira, B.R., Silva, J.S., Teixeira, M.M., Dias, J.M., Martin, T., Wells, T.N., Proudfoot, A.E., 2007. Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *The Journal of biological chemistry* 282, 27250-27258.

Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G., Way, M., 1999. Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* 401, 926-929.

Garcia-Arriaza, J., Najera, J.L., Gomez, C.E., Sorzano, C.O., Esteban, M., 2010. Immunogenic profiling in mice of a HIV/AIDS vaccine candidate (MVA-B) expressing four HIV-1 antigens and potentiation by specific gene deletions. *PLoS One* 5, e12395.

Gileva, I.P., Nepomnyashchikh, T.S., Antonets, D.V., Lebedev, L.R., Kochneva, G.V., Grazhdantseva, A.V., Shchelkunov, S.N., 2006. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different. *Biochim Biophys Acta* 1764, 1710-1718.

Giuri, S., 1998. [Corneal ulcerative lesions in type-I immediate hypersensitivity]. *Oftalmologia* 44, 20-26.

Gomez, C.E., Najera, J.L., Krupa, M., Esteban, M., 2008. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Current gene therapy* 8, 97-120.

Graham, G.J., Wilkinson, P.C., Nibbs, R.J., Lowe, S., Kolset, S.O., Parker, A., Freshney, M.G., Tsang, M.L., Pragnell, I.B., 1996. Uncoupling of stem cell inhibition from monocyte chemoattraction in MIP-1alpha by mutagenesis of the proteoglycan binding site. *EMBO J* 15, 6506-6515.

Graham, K.A., Lalani, A.S., Macen, J.L., Ness, T.L., Barry, M., Liu, L.Y., Lucas, A., Clark-Lewis, I., Moyer, R.W., McFadden, G., 1997. The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology* 229, 12-24.

Griffith, J.W., Sokol, C.L., Luster, A.D., 2014. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32, 659-702.

Hammond, M.E., Shyamala, V., Siani, M.A., Gallegos, C.A., Feucht, P.H., Abbott, J., Lapointe, G.R., Moghadam, M., Khoja, H., Zakel, J., Tekamp-Olson, P., 1996. Receptor recognition and specificity of interleukin-8 is determined by residues that cluster near a surface-accessible hydrophobic pocket. *The Journal of biological chemistry* 271, 8228-8235.

Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., Proudfoot, A.E., 2005. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* 74, 385-410.

Heidarieh, H., Hernaez, B., Alcamí, A., 2015. Immune modulation by virus-encoded secreted chemokine binding proteins. *Virus Res*.

- Homey, B., Alenius, H., Muller, A., Soto, H., Bowman, E.P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A.I., Assmann, T., Bunemann, E., Lehto, M., Wolff, H., Yen, D., Marxhausen, H., To, W., Sedgwick, J., Ruzicka, T., Lehmann, P., Zlotnik, A., 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 8, 157-165.
- Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S., Proudfoot, A.E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C.A., Wells, T.N., 1997. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* 36, 13570-13578.
- Hsiao, J.C., Chung, C.S., Chang, W., 1998. Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the N-terminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain. *Journal of virology* 72, 8374-8379.
- Hu, F.Q., Smith, C.A., Pickup, D.J., 1994. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* 204, 343-356.
- Huang, J., Smirnov, S.V., Lewis-Antes, A., Balan, M., Li, W., Tang, S., Silke, G.V., Putz, M.M., Smith, G.L., Kotenko, S.V., 2007. Inhibition of type I and type III interferons by a secreted glycoprotein from Yaba-like disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9822-9827.
- Hughes, D.J., Kipar, A., Leeming, G.H., Bennett, E., Howarth, D., Cummerson, J.A., Papoula-Pereira, R., Flanagan, B.F., Sample, J.T., Stewart, J.P., 2011. Chemokine binding protein M3 of murine gammaherpesvirus 68 modulates the host response to infection in a natural host. *PLoS pathogens* 7, e1001321.
- Isaacs, S.N., Kotwal, G.J., Moss, B., 1992. Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 628-632.
- Iyer, L.M., Balaji, S., Koonin, E.V., Aravind, L., 2006. Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus research* 117, 156-184.
- Jacoby, R.O., Bhatt, P.N., Brownstein, D.G., 1989. Evidence that NK cells and interferon are required for genetic resistance to lethal infection with ectromelia virus. *Arch Virol* 108, 49-58.
- Jezek, Z., Marennikova, S.S., Mutumbo, M., Nakano, J.H., Paluku, K.M., Szczeniowski, M., 1986. Human monkeypox: a study of 2,510 contacts of 214 patients. *The Journal of infectious diseases* 154, 551-555.
- Johnson, Z., Proudfoot, A.E., Handel, T.M., 2005. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 625-636.

- Karupiah, G., Buller, R.M., Van Rooijen, N., Duarte, C.J., Chen, J., 1996. Different roles for CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and macrophage subsets in the control of a generalized virus infection. *Journal of virology* 70, 8301-8309.
- Karupiah, G., Chen, J.H., Nathan, C.F., Mahalingam, S., MacMicking, J.D., 1998. Identification of nitric oxide synthase 2 as an innate resistance locus against ectromelia virus infection. *Journal of virology* 72, 7703-7706.
- Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C., MacMicking, J.D., 1993. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 261, 1445-1448.
- Kim, S., Jao, S., Laurence, J.S., LiWang, P.J., 2001. Structural comparison of monomeric variants of the chemokine MIP-1 β having differing ability to bind the receptor CCR5. *Biochemistry* 40, 10782-10791.
- Kimman, T.G., Pol, J.M., de Wind, N., Oei-Lie, N., Berns, A.J., Gielkens, A.L., 1992. Role of different genes in the virulence and pathogenesis of Aujeszky's disease virus. *Veterinary microbiology* 33, 45-52.
- Kofuku, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Terasawa, H., Hirai, T., Tominaga, S., Hirose, M., Maeda, Y., Takahashi, H., Terashima, Y., Matsushima, K., Shimada, I., 2009. Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *The Journal of biological chemistry* 284, 35240-35250.
- Kotwal, G.J., Moss, B., 1988. Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature* 335, 176-178.
- Krohn, S., Garin, A., Gabay, C., Proudfoot, A.E., 2013. The Activity of CCL18 is Principally Mediated through Interaction with Glycosaminoglycans. *Front Immunol* 4, 193.
- Kuo, N.W., Gao, Y.G., Schill, M.S., Isern, N., Dupureur, C.M., Liwang, P.J., 2014. Structural insights into the interaction between a potent anti-inflammatory protein, viral CC chemokine inhibitor (vCCI), and the human CC chemokine, Eotaxin-1. *The Journal of biological chemistry* 289, 6592-6603.
- Kuschert, G.S., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., Wells, T.N., 1999. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38, 12959-12968.
- Laguri, C., Arenzana-Seisdedos, F., Lortat-Jacob, H., 2008. Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example. *Carbohydrate research* 343, 2018-2023.
- Lalani, A.S., Graham, K., Mossman, K., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., Kelvin, D., McFadden, G., 1997. The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *Journal of virology* 71, 4356-4363.
- Lalani, A.S., Masters, J., Graham, K., Liu, L., Lucas, A., McFadden, G., 1999. Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M-T1, during myxoma virus pathogenesis. *Virology* 256, 233-245.

- Lalani, A.S., Ness, T.L., Singh, R., Harrison, J.K., Seet, B.T., Kelvin, D.J., McFadden, G., Moyer, R.W., 1998. Functional comparisons among members of the poxvirus T1/35kDa family of soluble CC-chemokine inhibitor glycoproteins. *Virology* 250, 173-184.
- Lateef, Z., Baird, M.A., Wise, L.M., Mercer, A.A., Fleming, S.B., 2009. Orf virus-encoded chemokine-binding protein is a potent inhibitor of inflammatory monocyte recruitment in a mouse skin model. *The Journal of general virology* 90, 1477-1482.
- Lateef, Z., Baird, M.A., Wise, L.M., Young, S., Mercer, A.A., Fleming, S.B., 2010. The chemokine-binding protein encoded by the poxvirus orf virus inhibits recruitment of dendritic cells to sites of skin inflammation and migration to peripheral lymph nodes. *Cell Microbiol* 12, 665-676.
- Lau, E.K., Allen, S., Hsu, A.R., Handel, T.M., 2004a. Chemokine-receptor interactions: GPCRs, glycosaminoglycans and viral chemokine binding proteins. *Adv Protein Chem* 68, 351-391.
- Lau, E.K., Paavola, C.D., Johnson, Z., Gaudry, J.P., Geretti, E., Borlat, F., Kungl, A.J., Proudfoot, A.E., Handel, T.M., 2004b. Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *The Journal of biological chemistry* 279, 22294-22305.
- Laurence, J.S., Blanpain, C., Burgner, J.W., Parmentier, M., LiWang, P.J., 2000. CC chemokine MIP-1 beta can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding. *Biochemistry* 39, 3401-3409.
- Laurence, J.S., Blanpain, C., De Leener, A., Parmentier, M., LiWang, P.J., 2001. Importance of basic residues and quaternary structure in the function of MIP-1 beta: CCR5 binding and cell surface sugar interactions. *Biochemistry* 40, 4990-4999.
- Law, M., Carter, G.C., Roberts, K.L., Hollinshead, M., Smith, G.L., 2006. Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5989-5994.
- Lefkowitz, E.J., Wang, C., Upton, C., 2006. Poxviruses: past, present and future. *Virus research* 117, 105-118.
- Lin, C.L., Chung, C.S., Heine, H.G., Chang, W., 2000. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *Journal of virology* 74, 3353-3365.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Loparev, V.N., Parsons, J.M., Knight, J.C., Panus, J.F., Ray, C.A., Buller, R.M., Pickup, D.J., Esposito, J.J., 1998. A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3786-3791.
- Lubman, O.Y., Cella, M., Wang, X., Monte, K., Lenschow, D.J., Huang, Y.H., Fremont, D.H., 2014. Rodent herpesvirus Peru encodes a secreted chemokine decoy receptor. *Journal of virology* 88, 538-546.

Luo, J., Luo, Z., Zhou, N., Hall, J.W., Huang, Z., 1999. Attachment of C-terminus of SDF-1 enhances the biological activity of its N-terminal peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 42-47.

Martinez-Martin, N., Viejo-Borbolla, A., Martin, R., Blanco, S., Benovic, J.L., Thelen, M., Alcami, A., 2015. Herpes simplex virus enhances chemokine function through modulation of receptor trafficking and oligomerization. *Nature communications* 6, 6163.

Martinez-Pomares, L., Thompson, J.P., Moyer, R.W., 1995. Mapping and investigation of the role in pathogenesis of the major unique secreted 35-kDa protein of rabbitpox virus. *Virology* 206, 591-600.

Mavian, C., Lopez-Bueno, A., Bryant, N.A., Seeger, K., Quail, M.A., Harris, D., Barrell, B., Alcami, A., 2014. The genome sequence of ectromelia virus Naval and Cornell isolates from outbreaks in North America. *Virology* 462-463, 218-226.

Mayr, A., Danner, K., 1978. Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions. *Developments in biological standardization* 41, 225-234.

McKenzie, R., Kotwal, G.J., Moss, B., Hammer, C.H., Frank, M.M., 1992. Regulation of complement activity by vaccinia virus complement-control protein. *The Journal of infectious diseases* 166, 1245-1250.

Meignier, B., Longnecker, R., Mavromara-Nazos, P., Sears, A.E., Roizman, B., 1988. Virulence of and establishment of latency by genetically engineered deletion mutants of herpes simplex virus 1. *Virology* 162, 251-254.

Mellado, M., Martinez, A.C., Rodriguez-Frade, J.M., 2002. Analysis of G-protein-coupled receptor dimerization following chemokine signaling. *Methods* 27, 349-357.

Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Manes, S., Martinez, A.C., 2001. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 19, 397-421.

Merchlinsky, M., 1990. Resolution of poxvirus telomeres: processing of vaccinia virus concatemer junctions by conservative strand exchange. *Journal of virology* 64, 3437-3446.

Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., Rot, A., 1997. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91, 385-395.

Miller, C.G., Shchelkunov, S.N., Kotwal, G.J., 1997. The cowpox virus-encoded homolog of the vaccinia virus complement control protein is an inflammation modulatory protein. *Virology* 229, 126-133.

Mohamed, M.R., Rahman, M.M., Rice, A., Moyer, R.W., Werden, S.J., McFadden, G., 2009. Cowpox virus expresses a novel ankyrin repeat NF-kappaB inhibitor that controls inflammatory cell influx into virus-infected tissues and is critical for virus pathogenesis. *Journal of virology* 83, 9223-9236.

Montanuy, I., Alejo, A., Alcami, A., 2011. Glycosaminoglycans mediate retention of the poxvirus type I interferon binding protein at the cell surface to locally block interferon antiviral responses. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 1960-1971.

- Mossman, K., Nation, P., Macen, J., Garbutt, M., Lucas, A., McFadden, G., 1996. Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. *Virology* 215, 17-30.
- Mossman, K., Upton, C., McFadden, G., 1995. The myxoma virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner. *The Journal of biological chemistry* 270, 3031-3038.
- Mullbacher, A., Hla, R.T., Museteanu, C., Simon, M.M., 1999. Perforin is essential for control of ectromelia virus but not related poxviruses in mice. *Journal of virology* 73, 1665-1667.
- Mutsafi, Y., Zauberman, N., Sabanay, I., Minsky, A., 2010. Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5978-5982.
- Nellen, A., Heinrichs, D., Berres, M.L., Sahin, H., Schmitz, P., Proudfoot, A.E., Trautwein, C., Wasmuth, H.E., 2012. Interference with oligomerization and glycosaminoglycan binding of the chemokine CCL5 improves experimental liver injury. *PLoS One* 7, e36614.
- Ng, A., Tschärke, D.C., Reading, P.C., Smith, G.L., 2001. The vaccinia virus A41L protein is a soluble 30 kDa glycoprotein that affects virus virulence. *The Journal of general virology* 82, 2095-2105.
- Okeke, M.I., Hansen, H., Traavik, T., 2012. A naturally occurring cowpox virus with an ectromelia virus A-type inclusion protein gene displays atypical A-type inclusions. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12, 160-168.
- Paavola, C.D., Hemmerich, S., Grunberger, D., Polsky, I., Bloom, A., Freedman, R., Mulkins, M., Bhakta, S., McCarley, D., Wiesent, L., Wong, B., Jarnagin, K., Handel, T.M., 1998. Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. *The Journal of biological chemistry* 273, 33157-33165.
- Palumbo, G.J., Buller, R.M., Glasgow, W.C., 1994. Multigenic evasion of inflammation by poxviruses. *Journal of virology* 68, 1737-1749.
- Panus, J.F., Smith, C.A., Ray, C.A., Smith, T.D., Patel, D.D., Pickup, D.J., 2002. Cowpox virus encodes a fifth member of the tumor necrosis factor receptor family: a soluble, secreted CD30 homologue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8348-8353.
- Parker, A.K., Parker, S., Yokoyama, W.M., Corbett, J.A., Buller, R.M., 2007. Induction of natural killer cell responses by ectromelia virus controls infection. *Journal of virology* 81, 4070-4079.
- Parry, C.M., Simas, J.P., Smith, V.P., Stewart, C.A., Minson, A.C., Efstathiou, S., Alcami, A., 2000. A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus. *The Journal of experimental medicine* 191, 573-578.
- Patel, D.D., Koopmann, W., Imai, T., Whichard, L.P., Yoshie, O., Krangel, M.S., 2001. Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clin Immunol* 99, 43-52.

- Pontejo, S.M., Alejo, A., Alcamí, A., 2015. Comparative Biochemical and Functional Analysis of Viral and Human Secreted Tumor Necrosis Factor (TNF) Decoy Receptors. *The Journal of biological chemistry* 290, 15973-15984.
- Price, N., Tschärke, D.C., Hollinshead, M., Smith, G.L., 2000. Vaccinia virus gene B7R encodes an 18-kDa protein that is resident in the endoplasmic reticulum and affects virus virulence. *Virology* 267, 65-79.
- Proudfoot, A.E., 2006. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. *Biochem Soc Trans* 34, 422-426.
- Proudfoot, A.E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J.P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P.R., Wells, T.N., 2001. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *The Journal of biological chemistry* 276, 10620-10626.
- Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., Kosco-Vilbois, M.H., 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1885-1890.
- Rajaratnam, K., Sykes, B.D., Kay, C.M., Dewald, B., Geiser, T., Baggiolini, M., Clark-Lewis, I., 1994. Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 264, 90-92.
- Reading, P.C., Khanna, A., Smith, G.L., 2002. Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence. *Virology* 292, 285-298.
- Reading, P.C., Symons, J.A., Smith, G.L., 2003. A soluble chemokine-binding protein from vaccinia virus reduces virus virulence and the inflammatory response to infection. *J Immunol* 170, 1435-1442.
- Reed, K.D., Melski, J.W., Graham, M.B., Regnery, R.L., Sotir, M.J., Wegner, M.V., Kazmierczak, J.J., Stratman, E.J., Li, Y., Fairley, J.A., Swain, G.R., Olson, V.A., Sargent, E.K., Kehl, S.C., Frace, M.A., Kline, R., Foldy, S.L., Davis, J.P., Damon, I.K., 2004. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *The New England journal of medicine* 350, 342-350.
- Riedel, S., 2005. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proceedings* 18, 21-25.
- Rimoin, A.W., Mulembakani, P.M., Johnston, S.C., Lloyd Smith, J.O., Kisalu, N.K., Kinkela, T.L., Blumberg, S., Thomassen, H.A., Pike, B.L., Fair, J.N., Wolfe, N.D., Shongo, R.L., Graham, B.S., Formenty, P., Okitolonda, E., Hensley, L.E., Meyer, H., Wright, L.L., Muyembe, J.J., 2010. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 16262-16267.
- Roberts, K.L., Smith, G.L., 2008. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends in microbiology* 16, 472-479.
- Rot, A., 1993. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur J Immunol* 23, 303-306.

- Rowe, R.K., Gill, M.A., 2015. Asthma: the interplay between viral infections and allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 35, 115-127.
- Rubio, D., Xu, R.H., Remakus, S., Krouse, T.E., Truckenmiller, M.E., Thapa, R.J., Balachandran, S., Alcami, A., Norbury, C.C., Sigal, L.J., 2013. Crosstalk between the type 1 interferon and nuclear factor kappa B pathways confers resistance to a lethal virus infection. *Cell Host Microbe* 13, 701-710.
- Ruiz-Arguello, M.B., Smith, V.P., Campanella, G.S., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Luster, A.D., Alcami, A., 2008. An ectromelia virus protein that interacts with chemokines through their glycosaminoglycan binding domain. *Journal of virology* 82, 917-926.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944-945.
- Sakala, I.G., Chaudhri, G., Buller, R.M., Nuara, A.A., Bai, H., Chen, N., Karupiah, G., 2007. Poxvirus-encoded gamma interferon binding protein dampens the host immune response to infection. *Journal of virology* 81, 3346-3353.
- Sakala, I.G., Chaudhri, G., Eldi, P., Buller, R.M., Karupiah, G., 2015. Deficiency in Th2 cytokine responses exacerbate orthopoxvirus infection. *PLoS One* 10, e0118685.
- Samuelsson, C., Hausmann, J., Lauterbach, H., Schmidt, M., Akira, S., Wagner, H., Chaplin, P., Suter, M., O'Keeffe, M., Hochrein, H., 2008. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J Clin Invest* 118, 1776-1784.
- Saphire, A.C., Bobardt, M.D., Zhang, Z., David, G., Galloway, P.A., 2001. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *Journal of virology* 75, 9187-9200.
- Saraiva, M., Alcami, A., 2001. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *Journal of virology* 75, 226-233.
- Saraiva, M., Smith, P., Fallon, P.G., Alcami, A., 2002. Inhibition of type 1 cytokine-mediated inflammation by a soluble CD30 homologue encoded by ectromelia (mousepox) virus. *The Journal of experimental medicine* 196, 829-839.
- Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E.J., Shida, H., Hiller, G., Griffiths, G., 1994. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *Journal of virology* 68, 130-147.
- Seet, B.T., Barrett, J., Robichaud, J., Shilton, B., Singh, R., McFadden, G., 2001a. Glycosaminoglycan binding properties of the myxoma virus CC-chemokine inhibitor, M-T1. *The Journal of biological chemistry* 276, 30504-30513.
- Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R., Barrett, J.W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S.H., Lucas, A., McFadden, G., 2003a. Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* 21, 377-423.
- Seet, B.T., McCaughan, C.A., Handel, T.M., Mercer, A., Brunetti, C., McFadden, G., Fleming, S.B., 2003b. Analysis of an orf virus chemokine-binding protein: Shifting ligand specificities among a family of

poxvirus viroceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15137-15142.

Seet, B.T., Singh, R., Paavola, C., Lau, E.K., Handel, T.M., McFadden, G., 2001b. Molecular determinants for CC-chemokine recognition by a poxvirus CC-chemokine inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9008-9013.

Shih, P.C., Yang, M.S., Lin, S.C., Ho, Y., Hsiao, J.C., Wang, D.R., Yu, S.S., Chang, W., Tzou, D.L., 2009. A turn-like structure "KKPE" segment mediates the specific binding of viral protein A27 to heparin and heparan sulfate on cell surfaces. *The Journal of biological chemistry* 284, 36535-36546.

Siciliano, N.A., Hersperger, A.R., Lacuanan, A.M., Xu, R.H., Sidney, J., Sette, A., Sigal, L.J., Eisenlohr, L.C., 2014. Impact of distinct poxvirus infections on the specificities and functionalities of CD4⁺ T cell responses. *Journal of virology* 88, 10078-10091.

Smith, C.A., Hu, F.Q., Smith, T.D., Richards, C.L., Smolak, P., Goodwin, R.G., Pickup, D.J., 1996. Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT alpha. *Virology* 223, 132-147.

Smith, C.A., Smith, T.D., Smolak, P.J., Friend, D., Hagen, H., Gerhart, M., Park, L., Pickup, D.J., Torrance, D., Mohler, K., Schooley, K., Goodwin, R.G., 1997. Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology* 236, 316-327.

Smith, G.L., Benfield, C.T., Maluquer de Motes, C., Mazzon, M., Ember, S.W., Ferguson, B.J., Sumner, R.P., 2013. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *The Journal of general virology* 94, 2367-2392.

Smith, G.L., McFadden, G., 2002. Smallpox: anything to declare? *Nat Rev Immunol* 2, 521-527.

Smith, G.L., Moss, B., 1983. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 25, 21-28.

Smith, P., Fallon, R.E., Mangan, N.E., Walsh, C.M., Saraiva, M., Sayers, J.R., McKenzie, A.N., Alcamí, A., Fallon, P.G., 2005. *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *The Journal of experimental medicine* 202, 1319-1325.

Smith, V.P., Alcamí, A., 2000. Expression of secreted cytokine and chemokine inhibitors by ectromelia virus. *Journal of virology* 74, 8460-8471.

Spellberg, B., Edwards, J.E., Jr., 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 32, 76-102.

Spriggs, M.K., Hruby, D.E., Maliszewski, C.R., Pickup, D.J., Sims, J.E., Buller, R.M., VanSlyke, J., 1992. Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell* 71, 145-152.

Symons, J.A., Alcamí, A., Smith, G.L., 1995. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 81, 551-560.

- Symons, J.A., Tschärke, D.C., Price, N., Smith, G.L., 2002. A study of the vaccinia virus interferon-gamma receptor and its contribution to virus virulence. *The Journal of general virology* 83, 1953-1964.
- Thomsen, D.R., Marchioli, C.C., Yancey, R.J., Jr., Post, L.E., 1987. Replication and virulence of pseudorabies virus mutants lacking glycoprotein gX. *Journal of virology* 61, 229-232.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., Kern, H., 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *European journal of cell biology* 60, 163-178.
- Tsung, K., Yim, J.H., Marti, W., Buller, R.M., Norton, J.A., 1996. Gene expression and cytopathic effect of vaccinia virus inactivated by psoralen and long-wave UV light. *Journal of virology* 70, 165-171.
- Upton, C., Macen, J.L., Schreiber, M., McFadden, G., 1991. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* 184, 370-382.
- Upton, C., Mossman, K., McFadden, G., 1992. Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. *Science* 258, 1369-1372.
- van Berkel, V., Barrett, J., Tiffany, H.L., Fremont, D.H., Murphy, P.M., McFadden, G., Speck, S.H., Virgin, H.I., 2000. Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action. *Journal of virology* 74, 6741-6747.
- van Berkel, V., Levine, B., Kapadia, S.B., Goldman, J.E., Speck, S.H., Virgin, H.W.t., 2002. Critical role for a high-affinity chemokine-binding protein in gamma-herpesvirus-induced lethal meningitis. *J Clin Invest* 109, 905-914.
- Van de Walle, G.R., May, M.L., Sukhumavasi, W., von Einem, J., Osterrieder, N., 2007. Herpesvirus chemokine-binding glycoprotein G (gG) efficiently inhibits neutrophil chemotaxis in vitro and in vivo. *J Immunol* 179, 4161-4169.
- Viejo-Borbolla, A., Martinez-Martin, N., Nel, H.J., Rueda, P., Martin, R., Blanco, S., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., Fallon, P.G., Alcami, A., 2012. Enhancement of chemokine function as an immunomodulatory strategy employed by human herpesviruses. *PLoS pathogens* 8, e1002497.
- Viejo-Borbolla, A., Munoz, A., Tabares, E., Alcami, A., 2010. Glycoprotein G from pseudorabies virus binds to chemokines with high affinity and inhibits their function. *The Journal of general virology* 91, 23-31.
- Wallich, R., Simon, M.M., Mullbacher, A., 2001. Virulence of mousepox virus is independent of serpin-mediated control of cellular cytotoxicity. *Viral Immunol* 14, 71-81.
- Wang, D., Bresnahan, W., Shenk, T., 2004. Human cytomegalovirus encodes a highly specific RANTES decoy receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16642-16647.

Webb, L.M., Clark-Lewis, I., Alcamí, A., 2003. The gammaherpesvirus chemokine binding protein binds to the N terminus of CXCL8. *Journal of virology* 77, 8588-8592.

Webb, L.M., Smith, V.P., Alcamí, A., 2004. The gammaherpesvirus chemokine binding protein can inhibit the interaction of chemokines with glycosaminoglycans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 571-573.

Weber, P.C., Levine, M., Glorioso, J.C., 1987. Rapid identification of nonessential genes of herpes simplex virus type 1 by Tn5 mutagenesis. *Science* 236, 576-579.

White, G.E., McNeill, E., Christou, I., Channon, K.M., Greaves, D.R., 2011. Site-directed mutagenesis of the CC chemokine binding protein 35K-Fc reveals residues essential for activity and mutations that increase the potency of CC chemokine blockade. *Mol Pharmacol* 80, 328-336.

Williams, G., Borkakoti, N., Bottomley, G.A., Cowan, I., Fallowfield, A.G., Jones, P.S., Kirtland, S.J., Price, G.J., Price, L., 1996. Mutagenesis studies of interleukin-8. Identification of a second epitope involved in receptor binding. *The Journal of biological chemistry* 271, 9579-9586.

Wittek, R., 1982. Organization and expression of the poxvirus genome. *Experientia* 38, 285-297.

Xiang, Y., Moss, B., 2003. Molluscum contagiosum virus interleukin-18 (IL-18) binding protein is secreted as a full-length form that binds cell surface glycosaminoglycans through the C-terminal tail and a furin-cleaved form with only the IL-18 binding domain. *Journal of virology* 77, 2623-2630.

Xu, R.H., Fang, M., Klein-Szanto, A., Sigal, L.J., 2007. Memory CD8⁺ T cells are gatekeepers of the lymph node draining the site of viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10992-10997.

Xue, X., Lu, Q., Wei, H., Wang, D., Chen, D., He, G., Huang, L., Wang, H., Wang, X., 2011. Structural basis of chemokine sequestration by CrmD, a poxvirus-encoded tumor necrosis factor receptor. *PLoS pathogens* 7, e1002162.

Ye, J., Kohli, L.L., Stone, M.J., 2000. Characterization of binding between the chemokine eotaxin and peptides derived from the chemokine receptor CCR3. *The Journal of biological chemistry* 275, 27250-27257.

Zhang, L., Derider, M., McCornack, M.A., Jao, S.C., Isern, N., Ness, T., Moyer, R., LiWang, P.J., 2006a. Solution structure of the complex between poxvirus-encoded CC chemokine inhibitor vCCI and human MIP-1 β . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 13985-13990.

Zhang, L., Lawrence, R., Frazier, B.A., Esko, J.D., 2006b. CHO glycosylation mutants: proteoglycans. *Methods Enzymol* 416, 205-221.

Zlotnik, A., Yoshie, O., 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.

Zlotnik, A., Yoshie, O., 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36, 705-716.

Zlotnik, A., Yoshie, O., Nomiyama, H., 2006. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 7, 243.

